UNIVERSITÉ DE STRASBOURG — FACULTE DE PHARMACIE
Année 1932–1933 — N° 100

Etude critique et comparative des différentes méthodes de dosage des lipides du lait

(Matières grasses et Lipoïdes)

Thèse

présentée et soutenue publiquement le Octobre 1933
à la FACULTÉ DE PHARMACIE DE STRASBOURG
pour obtenir le grade de Docteur de l'Université
(Mention Pharmacie)

par
Marcel FLATTER
Pharmacien
Licencié ès-sciences
Assistant à la Faculté de Pharmacie

Examinateurs de la Thèse :
MM. LOBSTEIN, Professeur, Président
F. JADIN, Professeur } Juges
TERROINE, Professeur }

IMPRIMERIE Ch. ROCH, STRASBOURG
1933

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548010_0030

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG FACULTÉ DE PHARMACIE

Année 1932—1933 N° 100

Etude critique et comparative des différentes méthodes de dosage des lipides du lait

(Matières grasses et Lipoïdes)

Thèse

présentée et soutenue publiquement le Octobre 1933
à la FACULTÉ DE PHARMACIE DE STRASBOURG
pour obtenir le grade de Docteur de l'Université
(Mention Pharmacie)

par

Marcel FLATTER
Pharmacien
Licencié ès-sciences
Assistant à la Faculté de Pharmacie

Examinateurs de la Thèse :

MM. LOBSTEIN, Professeur, Président
F. JADIN, Professeur
TERROINE, Professeur } Juges

IMPRIMERIE Ch. ROCH, STRASBOURG
1933

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

FACULTÉ DE PHARMACIE

ADMINISTRATION

MM. LOBSTEIN, Doyen, ✻, ⚗, I ✿, ⊛.
A. SARTORY, Assesseur, C. ✻, I ✿, C. ⊛.
CUVIER, Secrétaire. A ✿.

DOYEN HONORAIRE

M. JADIN, O. ✻, I ✿, ⊛.

PROFESSEURS

MM.	JADIN, O. ✻, I ✿, ⊛	Pharmacie chimique.
	A. SARTORY, C. ✻, I ✿, C. ⊛.	Bactériologie.
	LAVIALLE, I ✿, ⊛	Botanique.
	LABORDE, ✻, I ✿	Chimie organique.
	VOLMAR, I ✿	Analyse chimique.
	LOBSTEIN, ✻, ⊛, I ✿, ⚗	Matière médicale.
	GUILLAUME, ✻, ⚗, I ✿	Pharmacie galénique.

PROFESSEURS HONORAIRES

MM. BRAEMER, ✻, I ✿, O. ⊛
JADIN, O. ✻, I ✿, ⊛

CHARGÉ DES FONCTIONS D'AGRÉGÉ

M. R. SARTORY, ⊛

COURS COMPLÉMENTAIRES

MM.	LABORDE, ✻, I ✿	Chimie biologique.
	VOLMAR, I ✿	Chimie minérale.
	LOBSTEIN, ✻, ⊛, I ✿, ⚗	Hydrologie et Hygiène.
	GUILLAUME, ✻, ⚗, I ✿	Zoologie.
	R. SARTORY, ⊛	Cryptogamie
	COLLARD, I ✿, ⚗	Toxicologie.
	LAPP, A ✿	Physique.
	BRAEMER, ✻, I ✿, O. ⊛	Législation et Déontologie.

CHEFS DE TRAVAUX PRATIQUES

MM.	LAPP, A ✿	Chimie pharmaceutique.
	COLLARD, I ✿, ⚗	Chimie et Physique.
	R. SARTORY, ⊛	Bactériologie et Parasitologie.
	BOHN, A ✿	Histoire naturelle.

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

A mon Président de Thèse,

Monsieur le Professeur LOBSTEIN

Doyen de la Faculté de Pharmacie de Strasbourg,
Chevalier de la Légion d'honneur;

et aux Membres de mon Jury,

Monsieur le Professeur JADIN

Doyen honoraire de la Faculté de Pharmacie de Strasbourg,
Officier de la Légion d'honneur;

Monsieur le Professeur TERROINE

Directeur de l'Institut de Physiologie générale
de la Faculté des Sciences de Strasbourg,
Chevalier de la Légion d'honneur;

Hommage de respect et de reconnaissance.

A MES PARENTS ET AMIS

INTRODUCTION

Il y a deux ans, quand Monsieur le Professeur LOBSTEIN nous fit l'honneur de nous choisir comme assistant, des études sur l'extraction des lipides étaient en cours au Laboratoire de Matière Médicale. Notre confrère et ami, Monsieur P. ROBERT, ayant fait des essais comparatifs sur le fenugrec, le marron d'Inde, la farine et le cacao, se proposa d'étudier également le dosage des lipides du lait. Des difficultés imprévues et des circonstances indépendantes de sa volonté lui firent abandonner la question, les résultats provisoires obtenus n'étant guère satisfaisants. Monsieur le Professeur LOBSTEIN nous suggéra de reprendre le problème : les résultats de ces recherches font l'objet de la première partie de ce travail.

Nous avons essayé de combler une lacune dans la littérature du lait en soumettant à un examen critique les principales méthodes de dosage des lipides qu'il renferme, étude que nous avons fait précéder d'un historique succinct et de l'exposé rapide des différentes méthodes employées avec les indications bibliographiques qui s'y rapportent.

La deuxième partie de notre travail a trait aux phosphatides du lait, chapitre où les contradictions abondent comme le montrera l'exposé des recherches antérieures. En vue de cette étude, nous avons ajusté une méthode pour le microdosage du Phosphore lipoïdique. Puis, essayant toute une série de procédés d'extraction des phosphatides, nous avons abouti à une technique qui, sans être parfaite, nous paraît à peu près satisfaisante et susceptible d'être utilisée dans l'étude de la physiologie des phosphatides du lait.

Qu'il nous soit permis de remercier Monsieur le Professeur LOBSTEIN, Doyen de la Faculté, de la confiance qu'il nous a témoignée en nous choisissant comme assistant, et de l'honneur qu'il nous fait en acceptant notre collaboration. Tant de cordialité et de bienveillante sympathie augmentent infiniment

notre dette de reconnaissance envers notre cher maître et, dans l'impossibilité de nous en acquitter, nous nous permettons de lui présenter à cette occasion l'hommage de notre vive admiration et l'assurance de notre entier dévouement. C'est grâce aux conseils éclairés et aux encouragements de notre président de thèse que ce travail a pu être mené à bonne fin et ce serait pour nous la plus belle des récompenses si cette étude reflétait quelque peu la probité scientifique du maître, sa haute et vaste culture.

Nous remercions également Monsieur JADIN, Doyen et Professeur honoraires, qui, durant notre scolarité, s'est toujours vivement intéressé à nous. L'accueil aimable que nous avons trouvé sans cesse auprès de notre vénéré maître parut nous autoriser à venir le déranger dans la quiétude de sa retraite pour lui demander d'être notre juge. Qu'il veuille bien trouver ici, avec nos excuses, l'expression de notre reconnaissance émue.

Notre gratitude va également à Monsieur le Professeur TERROINE, dont nous avons l'honneur d'être l'élève depuis de nombreuses années. C'est à l'Institut de Physiologie Générale que, charmé par un enseignement lumineux et captivant, nous avons pris goût à la recherche scientifique. C'est également là que nous nous sommes familiarisé avec les méthodes de la biochimie, la science si subtile et si délicate de la vie. L'honneur que nous fait Monsieur le Professeur TERROINE en acceptant de faire partie de notre jury de thèse nous est précieux et nous l'en remercions infiniment.

Enfin, nous tenons à exprimer notre reconnaissance à tous nos Maîtres de la Faculté de Pharmacie qui ont présidé à notre éducation professionnelle et à ceux de la Faculté des Sciences qui ont contribué à parfaire notre instruction scientifique. Que la haute bienveillance des uns et des autres nous reste assurée encore bien longtemps, voilà le vœu que nous nous permettons de formuler en présentant, comme thèse de doctorat en Pharmacie, ce premier travail, humble fruit de leurs brillants enseignements.

PREMIERE PARTIE.

Dosage des matières grasses du lait.

CHAPITRE PREMIER.

APERÇU HISTORIQUE

« Jetant un regard sur le passé, nous avons reconnu que les questions les plus étudiées ne sont pas toujours celles qui présentent le moins d'intérêt pour le chimiste. »

(A. Chevallier et O. Henry: *Mémoire sur le lait, Journ. de Chim. méd.* 1839).

I. PERIODE EMPIRIQUE

Les connaissances, fort rudimentaires, il est vrai, sur les lipides du lait remontent à la plus haute antiquité. Dès l'aurore de la civilisation, l'homme utilisait le lait [1] des animaux et savait en retirer le beurre [2] par agitation dans un récipient quelconque. — Cette préparation du beurre peut être considérée comme le mode d'extraction le plus élémentaire des matières grasses. Du reste, le barattage constituait jusqu'au milieu du dix-neuvième siècle un procédé analytique de choix. Comme la balance était connue des Anciens, il est fort probable qu'on leur doit ce premier dosage et cela d'autant plus que la question du rendement n'échappait point à leur sagacité. Ainsi Dioscoride trouve qu'il est avantageux de préparer le beurre à partir d'un lait épais : lait de brebis ou de chèvre. Il indique également un moyen empirique pour reconnaître la qualité du lait : une goutte d'un bon lait, déposée sur l'ongle d'un doigt, reste bien sphérique et ne s'étale jamais. Ces critériums de pureté plus ou moins fantaisistes, nous les retrouvons également à une époque plus récente. Ainsi Hombert (53), dans une communication à l'Académie Royale des Sciences en 1712, affirme qu'un bon lait, riche

[1] Un aperçu historique sur le lait se trouve dans la thèse de doctorat en médecine de Hans Bab., Leipzig, 4 mars 1901 (6).

[2] Le beurre est mentionné dans: la Bible (Genèse XVIII), les Véda, Hérodote, Hippocrate (De morbis IV, 20), Dioscoride, Pline (Hist. nat. XXVIII, 35). Il était employé comme aliment par les « Barbares », comme médicament et onguent chez les Grecs et les Romains; il servait même d'offrande chez les Hindous et dans les premières églises chrétiennes.

en crème, « ne doit sentir sur un feu médiocre que la friture de beurre frais ou le gâteau un peu rôti ». Si le lait ainsi « analysé par le feu » sent mauvais, c'est qu'il y a trop peu de crème « pour couvrir entièrement l'odeur de matière caséeuse ».

Ce n'est que BERZÉLIUS [1] qui, en 1813, analysa d'une façon plus rationnelle la crème et le lait écrémé. Il emploie du reste pour l'extraction du beurre non pas quelque solvant connu depuis fort longtemps [2], mais la traditionnelle baratte utilisée depuis les temps les plus anciens. Cependant, les connaissances sur les lipides du lait se trouvèrent enrichies, peu de temps après, par les belles recherches de CHEVREUL (36) qui, de 1818 à 1823, isola les acides gras volatils du beurre: ac. butyrique, caproïque et caprique. A cette époque également, on avait déjà tout une série de notions concernant l'action des différents agents chimiques sur le lait, notions qui, plus tard, devaient servir à l'établissement des différents procédés de dosage des lipides du lait. C'est ainsi que l'on peut lire dans les « Elemens de Chimie médicale » de M. P. ORFILA (106), parus en 1817 : « M. Deschamps de Lyon a fait voir, en 1814, qu'en chauffant un mélange de deux parties de lait et d'une partie de vinaigre, on obtient un coagulum » qui, plus loin, est identifié comme étant « du caséum et du beurre » ; « l'alcool s'empare de l'eau contenue dans le lait et en précipite la matière caséeuse » tandis que « la potasse, la soude et l'ammoniaque, loin de précipiter le lait, dissolvent le caséum précipité par les acides ». Malgré ces faits nettement établis et en dépit des quelques 75 mémoires publiés sur la question par les savants de l'époque, l'analyse du lait ne fut pratiquée que très rarement et d'une façon fort rudimentaire. Pendant ce temps les fraudeurs écrémaient, mouillaient et falsifiaient impunément le lait malgré les ordonnances de police (105) de 1701, 1742, 1800 et 1813 alors en vigueur à Paris. « Le lait des grandes villes, de Paris surtout, est presque toujours plus ou moins altéré », écrit le Dictionnaire universel de Matière Médicale et de Thérapeutique générale (39) ; « quelque fois on se borne à l'écrémer ou à l'étendre d'eau ;

---

[1] La crème, séparée par différence de densité, a donné à Berzélius:

Beurre, obtenu par barattage	4,50
Fromage, obtenu par la coagulation du lait de beurre	3,50
Petit lait ou sérum	92,00

[2] La découverte de l'éther remonte à 1515.

plus souvent on cherche en outre, par addition de farine ou de fécule, etc., à masquer cette première fraude ». L'auteur ajoute que « l'autorité devrait surveiller soigneusement ces coupables falsifications » ; mais, pour tout moyen de contrôle, il fait appel à un « palais exercé » et suggère que « la fraude rend le lait plus facile à tourner, sujet à gratiner lorsqu'on le chauffe, etc. » Comme critérium de pureté, c'était évidemment un peu superficiel.

II. PERIODE SCIENTIFIQUE

A. — Différentes méthodes de dosage

Pour pouvoir juger, en toute connaissance de cause, de la valeur d'un lait, deux séries de recherches étaient nécessaires : — d'une part, il fallait étudier les variations que le lait subit sous des influences diverses et établir les caractéristiques physiques et chimiques d'un bon lait ; — d'autre part, il fallait créer des procédés de dosage ou trouver des « moyens de mieux apprécier la qualité du lait ». Ce double but a guidé vers 1840 les recherches de Chevallier et Henry (35), de Quevenne (121), de Donné (41) en France, et de Haidlen (64) en Allemagne.

Chevallier et Henry (35) préconisent pour le dosage de la crème une espèce d'éprouvette graduée qui n'est autre que le lactomètre, inventé par Banks en Angleterre, usité d'abord en Amérique, puis introduit en France par Valcourt. Cet instrument, dans l'esprit des auteurs, devait uniquement compléter les indications du densimètre. Quant à l'analyse chimique proprement dite, les auteurs proposent d'épuiser par l'éther chaud à trois reprises le coagulum obtenu en versant dans du lait bouillant un volume égal d'acide acétique étendu de deux fois son poids d'eau.

Quevenne (121) emploie plusieurs procédés de dosage des matières grasses:

1° Evaluation du volume de la crème par son crémomètre.
2° Extraction du beurre par battage.
3° — dessication de la crème sur du plâtre.
4° — un mélange éthéro-alcoolique agissant sur le coagulum obtenu par l'acide acétique dilué

et il conclut que « l'éther donne la proportion de beurre réel avec une grande exactitude, mais il n'en indique pas la qualité », comme le procédé du battage.

Quant à Donné (41), il préconise pour le dosage du beurre la détermination du degré d'opacité du lait, se basant sur le fait que cette opacité est proportionnelle à la quantité de graisse en suspension.

A la même époque, Haidlen (64), élève de Liebig, critiquant la méthode de Lecanu [1], propose d'évaporer le lait en présence de gypse à 100° et d'épuiser le résidu par de l'éther.

Mais les crémomètres et les lactodensimètres donnaient des résultats souvent contestés entre les mains du gendarme, — le précurseur de notre actuel inspecteur des fraudes. D'autre part, l'analyse chimique, trop compliquée, était uniquement à la portée des gens de laboratoire. Aussi E. Marchand (97), pharmacien à Fécamp, essaya-t-il de trouver un moyen terme entre le crémomètre aux résultats douteux et l'analyse chimique longue et laborieuse. Le procédé qu'il imagina repose sur la séparation du beurre fondu grâce à l'addition d'un mélange éthéro-alcoolique alcalinisé : il suffit de lire le volume de la couche butyreuse et de se reporter à la table de correspondance. La même année, le Dr Lecomte (83) montra que la séparation de la graisse est également possible en milieu fortement acide.

Les nombreuses méthodes qui ont été préconisées depuis lors découlent d'une façon plus ou moins évidente de ces premières tentatives de dosage. Tandis que l'école allemande [(Wicke (160), Otto (108), Brunner (100), Baumhauer (10)] s'employait à perfectionner le procédé de Haidlen, un chimiste de l'Université du Wisconsin, Babcock (7), mit au point un procédé de dosage volumétrique rapide, utilisant la force centrifuge et l'acide sulfurique comme dissolvant de la caséine. Puis, en 1879, Adam (1), pharmacien en chef de l'Hôpital Beaujon, modifia fort heureusement le procédé de Marchand : il en fit un procédé pondéral sûr, qui devait être modifié à son tour par Röse (131), Gottlieb (60) et Meillère (99). — Vers 1880, Soxhlet (144), professeur à Munich, conçut l'appareil d'épuisement qui porte son nom : cette découverte fit revivre les anciens procédés pon-

[1] Lecanu proposa de coaguler le lait par de l'alcool à 22°, d'évaporer le lactosérum et d'épuiser le tout par de l'éther (82).

déraux et suggéra de nouvelles méthodes [(Adams (2), Duclaux (44), Gantter (56), Dietrich (40) etc.] Le même auteur préconisa une méthode densimétrique pour le dosage des matières grasses du lait, méthode qui connut une certaine vogue en Allemagne. Pendant ce temps, le procédé de Babcock franchit l'Atlantique et devint, sous la forme que lui donna Gerber (57) de Zurich, un des procédés les plus employés en Europe. Mais la méthode de Gerber subit, elle aussi, quelques modifications : Sichler (140) utilisa à la place de l'acide sulfurique une solution de phosphate trisodique ; Wendler (159) employa d'abord une solution alcaline de sel de seignette, puis un mélange de salicylates et de citrates.

On alla même jusqu'à supprimer la centrifugation qui, à l'origine, était considérée comme présentant un avantage réel, et c'est ainsi que naquirent certaines méthodes volumétriques d'inégale importance [Fouard (52), Lindet (91), Hoyberg (72)], la dernière faisant actuellement une concurrence sérieuse à la méthode de Gerber. — En France, Bordas et Touplain (25) firent adopter par le Service de la Répression des fraudes une méthode officielle qui dérive des anciens procédés de Chevallier et de Quevenne: précipitation acétique du lait et épuisement éthéro-alcoolique du coagulum.

Plus récentes sont les microméthodes, quoique Guillot (61) donnât, dès 1900, une méthode de dosage des lipides dans le lait n'exigeant qu'une prise d'essai de 2 cm^3. Soit qu'elles constituent une simple réduction des procédés macrochimiques (Luhrig) (93), soit qu'elles reposent sur des principes plus ou moins originaux [Bloor (18), Polonovski et Lespagnol (115)], les microméthodes permettent des économies sensibles et se recommandent surtout pour le dosage des matières grasses du lait humain. Signalons enfin que, depuis 1870, une trentaine d'auteurs, étudiant les relations qui existent entre les différents constituants du lait, sont arrivés à établir des formules plus ou moins générales pour calculer indirectement les lipides du lait.

Tel est rapidement résumé, l'historique des méthodes de dosage des lipides du lait.

B. — Constitution des matières grasses du lait

La connaissance de la composition du beurre lui-même subit une évolution parallèle. Ce fut Chevreul (36) qui, le premier,

établit que le beurre donne par saponification de la glycérine et des acides gras : acides butyrique, caprique, caproïque, stéarique, margarique et oléique. A cette liste, Lerch (86) ajouta, en 1844, l'acide caprylique, et Heintz (66), dix ans plus tard, l'acide myristique et l'acide « butinique ». Ce dernier identifia également l'acide margarique comme étant un mélange d'ac. stéarique et palmitique. En 1867, Tolmatcheff (152) signala la présence de cholestérine et de lécithine dans la graisse du lait. Bondzynski (23) et Rufi crurent y trouver des oxyacides et Bengen les acides formique et acétique. Dans la suite, seule la présence de l'acide laurique a été confirmée et c'est tout récemment qu'on parvint à isoler du beurre les acides linoléique, linolénique et décylénique [1].

Voici, rassemblés dans un tableau (63), les acides gras contenus dans le beurre, d'après les données les plus récentes:

		Valeurs extrêmes %	Moyenne (d'après Hilditch) %
Ac. volatils:	Acide butyrique	2,9 — 4,5	4,3
	— caproïque	1,3 — 2,3	1,6
	— caprylique	1,0 — 1,9	1,2
	— caprique	1,0 — 1,5	1,2
Ac. fixes:	— laurique	3,6 — 6,4	5,0
	— myristique	10,4 —20,1	16,4
	— palmitique	11,8 —17,5	14,8
	— stéarique	1,1 — 5,9	3,4
Ac. non saturés:	— oléique	27,0 —47,0	44,8
	— linoléique	0,17— 0,25	0,2
	— linolénique	0,09— 0,17	0,1

Sous quelle forme ces acides gras sont-ils présents dans le beurre ? A l'origine, on croyait avoir affaire à des triglycérides simples (tristéarine, tripalmitine, trioléine, tributyrine, etc.). Mais bientôt les faits vinrent infirmer cette hypothèse. Ce sont Bell, puis Blyth et Robertson (21), qui, les premiers, réussirent à isoler une butyro-palmitooléine. Plus tard, en 1913, C. Amberger (4) obtint par des cristallisations fractionnées, à côté de la tristéarine, de la palmitodistéarine et de la dipalmi-

[1] Eckstein (H. C.) — The Highly unsaturated fatty acids in butter. J. of biolog. Chem. 1932, t. 97.

tostéarine. En 1918, reprenant cette étude sur du beurre hydrogéné, il aboutit aux conclusions suivantes : Le beurre ne renferme qu'une petite quantité de trioléine (2,4 %), le reste de l'acide oléique ainsi que les acides volatils se trouvent engagés dans des glycérides mixtes. Le beurre hydrogéné renferme les glycérides saturés correspondant à la butyrodioléine, la butyropalmitooléine et l'oléodipalmitine. Plus récemment, en 1929, De Collo et Scopinaro (38), en traitant le beurre par un mélange d'acétone et d'éther (3+1), réussirent à isoler la myristodipalmitine et la myristodistéarine. Grâce à une nouvelle méthode d'oxydation permanganique, Hilditch (69) trouva dans le beurre:

30 % de glycérides mixtes saturés,
34 — à un radical oléique,
36 — à deux radicaux oléiques.

Cette même méthode permit à G. Schuster (139) de retrouver les glycérides signalés par De Collo et Scopinaro et de caractériser en outre l'oléodistéarine et la butyrolaurooléine.

Au total les glycérides du beurre actuellement connus peuvent se grouper de la façon suivante :

Glycérides saturés		myristodipalmitine	(De Collo et Scopinaro)
		myristodistéarine	—
		palmitodistéarine	(Amberger)
		dipalmitostéarine	—
		tristéarine	—
Glycérides non saturés	1 ac. oléique	oléodipalmitine	—
		oléodistéarine	(Schuster)
		butyropalmitooléine	(Blyth et Robertson)
		butyrolaurooléine	(Schuster)
	2 ac. oléique:	butyrodioléine	(Amberger)
	3 ac. oléique:	trioléine	(Amberger)

Quant aux proportions relatives de ces différents glycérides, inutile de dire que les auteurs sont loin d'être d'accord. Du reste, l'on ignore encore le mode de liaison des acides caproïque, caprylique, caprique et d'une fraction des autres acides présents dans le beurre.

CHAPITRE II.

METHODES DE DOSAGE DES MATIERES GRASSES DU LAIT.

L'histoire des Lipides du Lait et de leur dosage, esquissée dans le précédent chapitre, montre combien nombreuses sont les méthodes de dosage des matières grasses du lait. Sans prétendre les énumérer toutes — énumération qui risquerait fort d'ailleurs de demeurer incomplète, car chaque laboratoire a pour ainsi dire son procédé propre ou une modification particulière d'une méthode connue — nous en exposerons du moins les principales, cet exposé nous paraissant utile pour expliquer l'objet de nos recherches.

Suivant une répartition classique, on peut distinguer deux groupes de méthodes pour le dosage des matières grasses dans le lait :

1° Les méthodes volumétriques,
2° — pondérales.

Nous y ajouterons, pour être plus complet:

3° Les méthodes densimétriques,
4° — optiques,
5° — indirectes (par calcul),
6° Les microméthodes.

I. METHODES VOLUMETRIQUES

Les Méthodes Volumétriques consistent à mesurer le volume des matières grasses soit qu'elles se séparent spontanément sous forme de crème, soit que l'on provoque leur séparation par quelque agent physique (force centrifuge, chaleur) ou quelque substance chimique (acide, alcali, sel) associée ou non à un solvant approprié des lipides. Du volume des matières grasses on déduit leur poids en se basant sur la densité moyenne du beurre ou sur une relation établie empiriquement. Les méthodes volumétriques peuvent se répartir en trois groupes:

1° Les Crémomètres,
2° Les Méthodes par voie chimique, sans centrifugation,
3° Les Méthodes par voie chimique, avec centrifugation.

A. Crémomètres

Les Crémomètres sont en général des tubes gradués, servant à mesurer la hauteur de la crème qui monte à la surface du lait. Il en existe plusieurs types:

a) Le *Crémomètre de Chevallier* (35) est une éprouvette de 25 cm de haut et 4 cm de large, graduée en 100 cm^3. Un bon lait doit donner au bout de 24 heures de repos 10 à 14 divisions de crème. Pour faciliter la lecture, Duclaux (44) a conseillé d'ajouter au lait 1 ou 2 gouttes de carmin d'indigo qui colore en bleu la couche inférieure sans passer dans la crème.

b) Le *Crémomètre de Quevenne* (121) est plus petit que celui de Chevallier: il n'a que 14 cm de haut.

c) Le *Crémomètre de Krocker* (51) est constitué par un récipient large en forme de coupe dont le fond porte un orifice bouché par un obturateur. Dans cet appareil on ne mesure non pas la crème mais le lait écrémé que l'on soutire avec précautions dans une éprouvette graduée. Le volume de la crème est donc égal à la différence.

d) Pour accélérer la séparation de la crème, qui, dans les méthodes précédentes, demande 24 heures, plusieurs auteurs ont préconisé l'utilisation de la force centrifuge. Le *Contrôleur Lefeldt* (51), le *Lactoscope de Berg* (14) et le *Contrôleur Fjord* (49) sont basés sur la détermination de la crème par simple centrifugation du lait.

B. Méthodes chimiques sans centrifugation

Les méthodes appartenant à ce groupe constituent en somme un perfectionnement des crémomètres. L'addition de certaines substances chimiques facilite en effet l'ascension des globules gras du lait.

La méthode de Lecomte (83), la première en date, consiste à mélanger 1 partie de lait avec 4 parties d'acide acétique cristallisable dans un tube terminé par une partie rétrécie et graduée : le beurre se sépare ; on le liquéfie en chauffant latéralement le tube et on lit le volume de la couche butyreuse rassemblée dans la partie graduée.

A peu près à la même époque, Marchand (97), pharmacien à Fécamp, proposa son *lacto-butyromètre*. C'est un tube de verre, fermé à l'une des extrémités et divisé en 3 capacités égales de 10 cm^3. La capacité la plus rapprochée de l'ouverture est divi-

sée, sur les 3/10 supérieurs, en dix parties qui constituent les degrés de l'instrument. On introduit le lait à essayer jusqu'au trait correspondant et, après avoir ajouté une goutte de lessive de NaOH à 36°, on remplit la deuxième capacité d'éther, on agite et l'on complète avec de l'alcool à 90°. L'instrument bouché est retourné plusieurs fois, puis on le plonge dans un bain-marie à 43°. La matière grasse se rassemble à la surface et on lit les degrés qu'elle occupe. Marchand a établi que sur 10 cm^3 de lait il reste invariablement 0,126 gr. de beurre dans le mélange éthéro-alcoolique. Comme chaque degré de l'appareil correspond à 2,33 gr. de beurre par litre de lait, le résultat du dosage est donné par la formule :

$$x = n.\ 2{,}33 + 12{,}6;$$

x étant la quantité de beurre par litre de lait.
n le nombre de degrés lus au lactobutyromètre.

Modifications: Le mélange se contractant, le ménisque supérieur de la couche butyreuse n'arrive souvent pas au 0 de l'appareil. Aussi Salleron (51) emploie-t-il un curseur mobile dont la graduation donne directement le taux de beurre pour un litre de lait. Tollens et Schmidt (137) utilisent de l'alcool à 91°, un bain-marie à 20° et n'ajoutent pas de NaOH pour éviter un début de saponification. La partie du tube où se sépare la couche butyreuse est rétrécie pour permettre une meilleure lecture. Méhu (9), voulant éviter, lui aussi, un début de saponification, emploie de l'alcool à 90° saturé à froid d'acide borique et opère pour le reste comme Marchand — sans mettre de soude naturellement. Au *Laboratoire Municipal de Paris* (77), on opère de la façon suivante: Sur 10 cm^3 de lait on verse 20 cm^3 d'une liqueur formée de

Alcool à 90°	500 cm^3
Ether sec	500 cm^3
NH^3 (d=0,920)	5 cm^3

On agite doucement et, après avoir porté l'appareil au bain-marie, à 43°, on lit le nombre de cm^3 de la couche butyreuse. La quantité de beurre par litre de lait s'obtient dans ces conditions par la formule:

$$x = n.\ 2{,}33 + 10{,}10.$$

Le *procédé d'Adam* n'est en somme qu'une modification de la méthode de Marchand. L'appareil d'Adam (1) ou galacto-

timètre se compose de deux boules séparées par un étranglement et d'un tube étroit gradué que terminent un robinet de verre et une courte tubulure effilée. La liqueur employée par l'auteur a pour formule:

Alcool à 90°	83,3	cm³
NH^3 (d=0,922)	3	cm³
H^2 0 q. s. p.	100	cm³

on mélange, et ajoute

Ether pur	110	cm³

On introduit dans l'appareil 10 cm³ de lait par aspiration; on y ajoute 32 cm³ du réactif, doucement et sans mélanger, afin d'éviter la formation de grumeaux. On retourne alors l'appareil un certain nombre de fois de manière à obtenir un liquide homogène. Au repos le mélange se divise en deux parties: 1° la couche supérieure renfermant le beurre en solution éthérée avec des traces d'alcool et d'eau; 2° la couche inférieure opalescente contenant le lactose, la caséine et les sels. On soutire ce liquide aqueux, puis on lave la solution éthérée à l'eau distillée, prudemment, en évitant de l'émulsionner. Après avoir soutiré l'eau de lavage, le dosage du beurre peut se faire de deux manières différentes : l'une pondérale, qui sera exposée plus loin; l'autre, volumétrique que voici: On verse dans l'appareil de l'acide acétique à 15 % jusqu'au trait de jauge de 32 cm³; on le soutire pour le remplacer par une même quantité du même acide. C'est sur cet acide que l'on évapore l'éther en plongeant l'appareil dans un bain-marie dont on élève graduellement la température jusqu'à 75°. On remplace alors une troisième fois l'acide acétique et l'on complète l'évaporation au bain-marie à 90°. Quand le beurre fondu est bien limpide, on le fait descendre dans la partie graduée du tube pour faire la lecture à 80°. Chaque division représente 1 gr. de beurre par litre de lait.

L'*alcalicrémométrie,* préconisée par le Dr. Quesneville (120), consiste à ajouter au lait 1 % de la liqueur suivante:

NH^3 (d=0,93)	225	cm³
KOH (d=1,34)	32	cm³

on porte le crémomètre au bain-marie à 40° pendant 10 à 12 heures et on lit le nombre de divisions occupées par la crème.

La *méthode de Nahm* (101) est basée sur le même principe.

Celle de Fouard (52) consiste à dissoudre la caséine dans la liqueur suivante:

Potasse caustique	10 gr
Alcool ethylique	50 cm³
— amylique	15 cm³

on complète à 100 cm³ avec de l'Ammoniaque. Dans un butyromètre spécial ou ballon de Lézé, dont le col est gradué en dixièmes de cm³, on verse 20 cm³ de lait et 10 cm³ de réactif; on porte au bain-marie bouillant pendant 15 minutes en agitant de temps en temps. On verse alors dans le butyromètre un peu d'eau chaude, afin d'amener le beurre dans la partie graduée du col et on lit son volume à 40°. Lézé (90) a légèrement modifié la formule du réactif en remplaçant la potasse par la soude; de plus, il opère sur 36 cm³ de lait, ce qui lui permet d'établir une relation simple entre le volume lu et la richesse du lait en beurre:

$$p = \frac{V \times 100}{4}$$

En 1899, Tsvett (153) remarqua que les protides sont solubles dans une solution concentrée de résorcine. Un an plus tard, Lindet (91) proposa une méthode de dosage des lipides du lait basée sur cette propriété. Dans une ampoule cylindrique en verre on introduit 5 gr. de résorcine, 5 cm³ de lait, 2 gouttes de lessive de soude à 36° B. et une goutte de matière colorante. On dispose l'appareil dans un bain-marie profond : la caséine se dissout et la matière grasse surnage ; on la fait passer dans la partie graduée de l'appareil en ajoutant du mercure, parce que l'addition d'eau précipiterait la caséine, soluble seulement dans la résorcine concentrée.

La méthode préconisée récemment par le Dr Hoyberg (72) de Copenhague se rapproche de la méthode de Fouard (52), mais elle constitue également une transition avec les méthodes par centrifugation dont elle n'est qu'une simplification. On verse 9 cm³,7 de lait dans un butyromètre, on ajoute 2 cm³,4 d'une solution de sel de seignette à 36 %, 1 cm³ de lessive de soude à 30 % et 0 cm³,6 d'alcool isobutylique. On porte au bain-marie à 60°—70° et après quelques agitations on lit la hauteur occupée par la matière grasse. Cette technique subit différentes modifications dans la suite : 1° le séjour au bain-marie fut prolongé (21 minutes) ; 2° l'alcool isobutylique pur fut remplacé par un mélange d'alcool isobutylique et d'alcool mé-

thylique, dont on prend 1 cm³ pour un dosage. Pour éviter une altération de la graisse, B. Spur (145) proposa d'abaisser la température du bain-marie à 50°—52°: l'opération demande alors 25 minutes.

C. Méthodes chimiques avec centrifugation

Pour rendre la séparation de la matière grasse plus complète et plus rapide, quelques auteurs se sont adressés à la force centrifuge. Les méthodes de ce groupe, qui reposent toutes sur le même principe, diffèrent entre elles surtout par la nature de la substance chimique utilisée pour la liquéfaction de la caséine.

La *méthode de Babcock* (7), officielle en Amérique, est la première en date de ces méthodes. La liquéfaction de la caséine s'obtient par addition d'acide sulfurique concentré. Avec une pipette étalon (jaugée à 17,6 cm³ d'eau à 20°), on met du lait dans la bouteille normale (petite bouteille avec col cylindrique gradué et dont chaque division correspond à 0 gr. 10 de beurre p. 100 cm³ de lait), on ajoute 17,5 cm³ d'acide sulfurique (d=1,82—1,83) et, après avoir bien mélangé, l'on centrifuge pendant 4 minutes. Puis on ajoute de l'eau bouillante de manière à remplir la bouteille jusqu'au col. On agite une minute et l'on fait monter alors la matière grasse à la hauteur de la graduation. Le volume qu'elle occupe à 57°—60° donne directement le pourcentage de graisse du lait.

En Europe, les premières méthodes par centrifugation n'eurent pas beaucoup de succès. [Lindström (155), Patrik de Laval (81), Thörner (149)] Plus heureux fut le *procédé de Gerber* (57), qui, comme celui de Babcock (7), repose sur la dissolution de la caséine par un acide fort et la séparation de la matière grasse par la force centrifuge. L'appareil préconisé par l'auteur, et dénommé *acidobutyromètre*, se compose d'un réservoir cylindrique en verre, fermé par un bouchon de caoutchouc, et d'un tube étroit portant une graduation. On introduit successivement dans l'appareil:

10 cm³ d'acide sulfurique incolore (d=1,820—1,826 à 15°);
11 cm³ de lait à 15°;
1 cm³ d'alcool amylique (d=0,815; P. E. 128°—130°).

On ferme le butyromètre avec son bouchon de caoutchouc; on l'agite vigoureusement jusqu'à dissolution complète de la caséine,

puis on retourne l'appareil à plusieurs reprises pour bien mélanger le tout. On place alors le butyromètre, le bouchon tourné vers le bas, dans un bain-marie à 70°. Au bout de 10 à 15 minutes on l'introduit dans un tube métallique d'un centrifugeur spécial, le bouchon vers l'extérieur et l'on centrifuge pendant 5 minutes à la vitesse de 700 à 800 tours à la minute. Le butyromètre est porté de nouveau au bain-marie à 70° pendant quelques minutes; on le retire rapidement et on lit dans le tube gradué le nombre de divisions qu'occupe la couche butyreuse. Chaque division correspond à 1 gr. de beurre par litre de lait. Au lieu d'employer de l'acide sulfurique pour la liquéfaction de la caséine, Sichler (140) a proposé du phosphate trisodique, auquel Lotterhos a ajouté du citrate trisodique. D'autre part, l'alcool amylique du procédé de Gerber est remplacé par de l'alcool isobutylique coloré avec une matière colorante liposoluble, ce qui facilite la lecture. On introduit donc dans un butyromètre spécial : 10 cm^3 d'une solution renfermant 15 % de phosphate et 1 % de citrate trisodiques, 10 cm^3 de lait et 1 cm^3 d'alcool isobutylique. On bouche l'appareil et, après l'avoir agité, on le porte au bain-marie à 75°—90°. On centrifuge pendant une minute et on lit la hauteur de la couche butyreuse à 75°.

Wendler et Gerber (159) ont conseillé l'emploi d'une solution obtenue en dissolvant dans un litre d'eau 230 gr. d'un mélange de soude, sel de Seignette, chlorure de sodium et d'un colorant rouge (mélange « Sal »). Le tartrate empêche la précipitation des sels de calcium, et le sel marin augmente la densité du liquide. On place dans un butyromètre Gerber 11 cm^3 de cette solution, 0,6 cm^3 d'alcool isobutylique et enfin 10 cm^3 de lait. On agite et porte au bain-marie à 45° pendant 3 minutes. On centrifuge également 3 minutes et on lit la hauteur de la colonne de graisse dans le bain-marie à 45°.

Plus récemment, Wendler a préconisé un mélange de salicylates [1] et de citrates, additionné d'un colorant bleu, pour liqué-

[1] En 1932, W. E. Petersen (Br. Ch. Abst. 1932, p. 996) préconise pour le dosage volumétrique de la matière grasse du lait le réactif suivant:

Salicylate de soude ou benzoate de potasse	400 gr.
Bicarbonate de soude	210 gr.

On complète à 1000 cm^3 avec de l'eau et l'on ajoute:

Lessive de potasse à 50 %	40 cm^3
Alcool butylique ou methylique	80 cm^3

On chauffe à 120° et on centrifuge: la matière grasse se sépare en une couche nettement délimitée.

fier la caséine ; de plus, il a modifié la formule de la liqueur alcoolique. Ce procédé est connu sous le nom de « Neusal ».

II. METHODES PONDERALES

Les Méthodes Pondérales reposent sur une extraction de la matière grasse par des procédés variés et la pesée de l'extrait obtenu. Primitivement on retirait le beurre par barattage du lait ou de la crème. Mais ces procédés étant reconnus bientôt insuffisants, on opérait alors sur du lait desséché en présence d'une matière inerte. Enfin, dans les méthodes plus récentes, tantôt on épuise le coagulum produit par la précipitation de la caséine, tantôt on extrait le beurre après solubilisation des protides.

Voici, rassemblées dans un tableau, les principales méthodes pondérales préconisées pour le dosage des lipides dans le lait.

EXTRACTION du BEURRE

- par **barattage du lait ou de la crème.**
- par **dessication de la crème sur du plâtre** (Quévenne)
- par **épuisement du lait** (au moyen d'un ou de plusieurs solvants)
  - **desséché**
    - sans adjuvant (Péligot, Boussingault)
    - au moyen de
      - plâtre (Haidlen, Soxhlet)
      - sulfate de baryte (Wicke)
      - sable (Otto, Baumhauer, Hofmeister, Vogel)
      - charbon de bois (Brunner)
      - marbre (Grandeau, Kühn)
      - verre pilé
      - pierre ponce
      - papier filtre (Adams)
      - éponge (Duclaux, Bellier)
      - cellulose (Gantter)
      - coton (Dietrich)
      - amiante (Timpe)
      - sulfate de soude (Le Comte, Paget)
  - **alcalinisé**
    - avec
      - Na OH (Hoppe-Seyler)
      - NH^3 (Adam, Meillère, Rôse, Gottlieb, Brioux)
  - **acidifié**
    - avec HCl (Schmid, Bondzynski)
  - **coagulé**
    - par
      - présure (Duflos)
      - hydrate cuivrique (Ritthausen)
      - ac. acétique dilué (Chevalier et Henry) (Quévenne) (Lab. Munic. Paris)
      - alcool acétique (Méthode officielle)

Nous ne citerons que pour mémoire le *procédé du battage*, qui consistait à agiter dans une baratte, la crème provenant de 1 litre de lait abandonné pendant 3 jours à basse température.

Quant au procédé de *dessication de la crème sur du plâtre,* utilisé par Quevenne (121), nous le mentionnons seulement.

A. Extraction du beurre par épuisement du lait desséché

Les méthodes basées sur ce principe peuvent se grouper en 2 catégories: a) les méthodes anciennes où l'épuisement se faisait de façons diverses; b) les méthodes plus récentes où l'épuisement se fait au *Soxhlet.*

1° *Méthodes anciennes*

Péligot (111) évapore le lait au bain-marie et traite le résidu par un mélange d'alcool et d'éther qui dissout le beurre.

Boussingault (24) opère de la même manière, mais épuise par de l'éther pur.

Haidlen (64) évapore le lait à 100° en présence d'une égale quantité de gypse et épuise le résidu par de l'éther.

Wicke (160) préconise le $S\,0^4\,Ba$ à la place du $S\,0^4\,Ca$ dont l'eau de composition présente des inconvénients.

Otto (108) et Baumhauer (10) se servent, dans le même but, de sable quartzeux pur et assez fin. Baumhauer opère de la façon suivante: On dispose, dans un filtre, du sable sur lequel on verse 10 cm^3 de lait; on dessèche le tout dans une étuve portée à 105° pendant 4 heures. Le résidu est épuisé par de l'éther dans un entonnoir à robinet. Le filtre pesé avant et après extraction donne la richesse en matière grasse du lait.

D'après Brunner (100), on dessèche à une douce chaleur 20 gr. de lait dans lequel on a délayé 10 gr. de charbon de bois grossièrement pulvérisé; la poudre introduite dans une allonge en verre est épuisée à froid par de l'éther, le dernier lavage se faisant avec un mélange de 1 partie d'éther pour 3 parties d'alcool. On pèse le beurre après évaporation des solvants.

Les méthodes de Grandeau et Kühn (70) consistent à dessécher le lait en présence de marbre pulvérisé et à épuiser le résidu par lixiviation avec de l'éther.

Duclaux (44) dispose dans un absorbeur spécial une éponge fine préalablement lavée à l'éther; il y verse 10 cm^3 de lait qu'il dessèche au bain-marie bouillant dans un courant d'air sec jusqu'à poids constant. L'éponge est alors épuisée dans l'appareil même par de l'éther anhydre ou du sulfure de carbone jusqu'à ce qu'une partie du solvant évaporé ne laisse plus de résidu.

Le poids de graisse s'obtient par la pesée de l'appareil avant et après extraction.

2° *Méthodes utilisant l'extraction des lipides au Soxhlet*

Soxhlet (51) lui-même a modifié le procédé de Haidlen (64) en épuisant dans son appareil d'extraction le résidu du lait desséché en présence de gypse.

Un autre procédé de dosage consiste à mélanger dans une nacelle de Hoffmeister (79) ou de Vogel 10 cm³ de lait avec 15 gr. de sable; on dessèche le tout à l'étuve et, après avoir introduit le résidu dans la cartouche d'un Soxhlet, on l'épuise par de l'éther.

D'après Adams (2), 5 à 10 gr. de lait sont étendus d'un jet de pissette sur une bande de papier filtre de 56×6,5 cm. Le papier, une fois desséché à l'air, est enroulé, chauffé à 100°, puis épuisé avec de l'éther au Soxhlet.

Dans la méthode de Gantter (56), on verse 5 à 6 gr. de lait sur 2 gr. de cellulose, préalablement desséchée à 105° et placée dans une capsule; on porte la capsule au bain-marie, puis à l'étuve pendant 2 heures et demie. Le résidu, introduit dans la cartouche d'un Soxhlet, est extrait pendant 2 heures avec de l'éther de pétrole. Quant à Dietrich (40), il emploie du coton hydrophile comme support pour la dessication du lait.

Timpe (150) opère de la façon suivante: Dans un creuset de Gooch, bourré d'amiante, il verse 5 cm³ de lait, qu'il pèse. Il dessèche alors le tout à l'étuve jusqu'à poids constant et introduit le creuset dans un Soxhlet pour l'épuiser à l'éther.

Bellier (13) reprend le procédé à l'éponge, préconisé par Duclaux; mais l'épuisement se fait au Soxhlet avec de l'éther ou de la benzine.

Enfin, Le Comte (84) et, tout récemment, Paget (109) mélangent le lait avec du sulfate de soude anhydre et épuisent la masse pulvérisée avec de l'éther au Soxhlet pendant 3 heures.

B. Extraction du beurre par épuisement du lait alcalinisé

Le lait alcalinisé cède, par simple agitation, sa matière grasse à l'éther; tel est le principe des méthodes de Hoppe-Seyler, Adam et Röse-Gottlieb.

Méthode de Hoppe-Seyler (79): 20 cm³ de lait sont mélangés dans un flacon bouché émeri avec 20 cm³ d'une solution forte

de NaOH et 100 cm³ d'éther. Au bout d'une demi-heure on décante la solution éthérée et l'on agite le lait alcalinisé avec une nouvelle portion d'éther jusqu'à ce que l'épuisement soit total. Les solutions éthérées réunies sont évaporées et le résidu est desséché à 100°, puis pesé.

La variante gravimétrique du *procédé d'Adam* (1) que nous avons exposé avec les méthodes volumétriques, s'effectue de la façon suivante : La solution éthérée du beurre, lavée à l'eau, est recueillie dans une capsule tarée; on lave l'appareil avec quelques cm³ d'éther et l'on dessèche le tout jusqu'à poids constant. Le beurre obtenu correspond à 10 cm³ de lait. Meillère (99) a apporté à ce procédé quelques modifications de détail: il supprime d'abord le tube gradué de l'appareil d'Adam, devenu inutile, qu'il remplace par une sorte d'ampoule effilée; pour éviter l'entraînement d'impuretés par l'éther, il ajoute, comme Röse et Gottlieb, de l'éther de pétrole à la liqueur d'Adam.

Méthode de Röse (131) *et Gottlieb* (60): 10 gr. de lait sont pesés dans un tube spécial; on y ajoute successivement 2 cm³ d'NH³ à 10 %, 10 cm³ d'alcool absolu, 25 cm³ d'éther et 25 cm³ d'éther de pétrole à point d'ébullition faible. On agite chaque fois, puis on abandonne au repos pendant 2 heures. Au bout de ce temps on lit le volume de la couche éthérée qui s'est séparée; on en prélève 25 ou 40 cm³, qui, après évaporation de l'éther, sont desséchés à 100° pendant une heure. Un simple calcul permet de trouver le pourcentage de beurre contenu dans le lait, connaissant la quantité de lait en essai, le volume total de la couche éthérée, la fraction soumise à l'évaporation et le poids de graisses obtenu.

Modifications: a) Au lieu d'employer une éprouvette graduée comme Gottlieb, divers auteurs ont imaginé des dispositifs spéciaux qui présentent certains avantages. Farnsteiner (47) emploie un tube gradué de 75 cm³, bouché émeri, présentant 2 renflements. Röhrig (130) préconise une éprouvette graduée à pied, munie d'un robinet latéral à la hauteur de la division 25, ce qui permet de soutirer plus facilement la solution éthérée. Rieter (124), dans ce même but, coude l'éprouvette en question dans un angle de 45° toujours à la hauteur de la division 25. Brioux (30) recommande un butyromètre coudé, analogue à celui de Rieter; l'écoulement de la solution éthérée se fait d'une façon rapide grâce à un dispositif rappelant celui des flacons compte-

gouttes. Adorjan (3) place à l'extrémité inférieure du tube un robinet par lequel on peut soutirer le sérum lacté. Eichloff et Grimmer (46) estiment qu'il est plus juste d'évaporer la totalité de la solution éthérée et de rincer l'appareil 2 fois à l'éther : dans ces conditions, on peut se passer d'un tube gradué et employer un flacon ordinaire ou un ballon. Bremer et Greifenhagen (29) préconisent un appareil analogue à celui de Röhrig, mais le robinet se prolonge à l'intérieur par un tube qui remonte dans la solution éthérée.

b) Quant au point d'ébullition de l'éther de pétrole employé, c'est 80° pour Gottlieb, 60° pour Popp, Eichloff et Grimmer, 50° pour Siegfried.

C. Extraction du beurre par épuisement du lait acidifié

Méthode de Schmid (136) : On fait bouillir 10 cm^3 de lait avec 10 cm^3 d'acide chlorhydrique; on laisse refroidir le liquide brun foncé jusqu'à 40° et l'on y ajoute 30 cm^3 d'éther. Au bout de 15 à 20 minutes, on mesure le volume de la solution éthérée qui s'est séparée. On en évapore une fraction et l'on pèse le résidu desséché à 100°.

Bondzynski (23) emploie pour ce dosage un tube gradué à 2 renflements.

D. Extraction du beurre par épuisement du lait coagulé

Toutes les fois que, par l'addition d'une substance chimique, on provoque la formation dans le lait d'un précipité insoluble, ce précipité entraîne plus ou moins complètement les globules gras en suspension. C'est sur ce principe qu'est basée l'extraction du beurre par épuisement du lait coagulé. Cette précipitation est obtenue surtout par les acides (acétique, chlorhydrique, sulfurique etc.), mais également par d'autres corps tels que l'alcool, la présure et certains sels.

Méthode de Chevallier et Henry (35) : On verse dans du lait bouillant un égal volume d'acide acétique préalablement étendu de 2 fois son poids d'eau. Le « caséum » filtré, lavé, égoutté est traité par de l'éther chaud « en assez grande quantité et à trois reprises différentes ». Le beurre est pesé après évaporation de l'éther et dessication du résidu.

Quevenne (121) opère d'une façon analogue, mais il épuise le coagulum par un mélange d'alcool et d'éther à parties égales. Au *Laboratoire Municipal de Paris* (77), on emploie la technique suivante: Dans un entonnoir à robinet, on dispose un filtre sur lequel on verse 90 cm³ d'une solution d'acide acétique à 2 p. 1000, puis 10 cm³ de lait. Le coagulum débarrassé du lacto-sérum est abandonné à l'air libre pendant quelques heures, puis introduit dans un extracteur de Soxhlet et épuisé à l'éther.

Dans la *méthode officielle*, la précipitation de la caséine s'obtient en versant 10 cm³ de lait dans 25 cm³ d'alcool à 65° acidifié à 1 p. 1000 par de l'acide acétique. Le coagulum une fois obtenu, la méthode officielle indique 2 modus operandi pour terminer le dosage:

1° Un procédé par centrifugation qui consiste à laver le coagulum avec de l'alcool à 50°—55°, puis à l'épuiser à froid d'abord avec un mélange d'alcool et d'éther (10 cm³ d'alcool + 20 cm³ d'éther), ensuite avec de l'éther pur, et cela en opérant par centrifugations et décantations successives.

2° Un procédé sans centrifugation qui prévoit 4 lavages du coagulum sur filtre avec de l'alcool à 35°, suivis d'un épuisement avec l'éther, au Soxhlet, du précipité préalablement humecté avec 10 cm³ d'alcool à 95°.

Citons, enfin, pour mémoire, à cause de leur originalité, d'une part, le procédé de Duflos (45), qui consiste à coaguler le lait par la présure et à épuiser par un mélange éthéro-alcoolique le coagulum préalablement desséché; — d'autre part, l'essai d'analyse systématique du lait de Ritthausen (125), qui provoque, par l'addition successive de sulfate de cuivre et de potasse, un précipité d'hydrate cuivrique entraînant les matières albuminoïdes et les graisses; on filtre: le filtrat sert au dosage direct du lactose et le précipité, séché à basse température, est humecté avec de l'alcool puis épuisé à l'éther au Soxhlet; la solution éthérée évaporée à sec, donne la teneur en beurre du lait analysé.

III. METHODES DENSIMETRIQUES

La densité d'une solution est fonction de la concentration de la substance dissoute, tel est le principe des Méthodes densimétriques.

1° *Méthode de Soxhlet* (144)

Si l'on agite une quantité déterminée de lait avec de la lessive de potasse et un volume connu d'éther, les matières grasses du lait passent dans l'éther: la densité de cette solution éthérée est fonction de la quantité de « beurre » contenu dans le lait en essai. Il suffit de déterminer empiriquement la correspondance numérique. — Soxhlet opère de la façon suivante: 200 cm^3 de lait sont agités avec 10 cm^3 d'une lessive de KOH (d=1,27); puis on ajoute 60 cm^3 d'éther humide et l'on porte le flacon soigneusement bouché dans un thermostat à 17°—18°, après l'avoir agité plusieurs fois. On laisse reposer un quart d'heure. La solution éthérée est transvasée par siphonage dans une allonge dans laquelle est disposé un densimètre, le tout étant entouré d'un manchon renfermant de l'eau à 17°, 5. Il faut avoir soin d'éviter toute évaporation d'éther, ce qui évidemment fausserait les résultats. Le densimètre donne directement le pourcentage en matières grasses. Pour faciliter la séparation de la couche éthérée, l'auteur utilise une centrifugeuse de sa construction, tandis que G. Schmöger préconise l'addition d'une solution de sulfate de potassium.

2° *Méthode de Timpe* (151)

Timpe a donné un procédé en tous points identique à celui de Soxhlet, avec cette seule différence que la liquéfaction de la caséine est obtenue par de l'acide sulfurique concentré.

IV. METHODES OPTIQUES

Si l'on considère le principe des méthodes optiques servant à la détermination des matières grasses dans le lait, on peut distinguer deux groupes de procédés:

1° ceux qui sont basés sur la détermination du degré d'opacité du lait pur ou dilué;

2° ceux qui reposent sur la détermination de l'indice de réfraction des matières grasses en solution éthérée.

Parmi les procédés appartenant au premier groupe, nous citerons les lactoscopes de Donné, Vogel et Feser et le miroir de Heusner.

Quant à la détermination de l'indice de réfraction, elle a surtout été envisagée par Wollny.

A. Opacimètres

L'opacité du lait est due aux globules de matières grasses qu'il tient en suspension; elle sera d'autant plus forte que le lait sera plus riche en beurre. Les opacimètres, en donnant le degré d'opacité d'un échantillon de lait, nous renseignent donc sur sa teneur en lipides:

1° Le *Lactoscope de Donné* (41) se compose d'une petite cuve, destinée à recevoir le lait, dont les parois sont formées par 2 verres parallèles. L'un des verres est fixe ; l'autre se déplace au moyen d'une vis micrométrique. On verse environ 2 cm^3 de lait dans la cuve et l'on regarde, à travers l'instrument, une bougie allumée, placée à 1 mètre de distance; l'opération doit se faire dans l'obscurité. En déplaçant le verre mobile, on cherche la position pour laquelle les contours de la flamme disparaissent : à ce moment, la division de l'oculaire donne, d'après une table établie empiriquement, la proportion de crème contenue dans le lait. Un bon lait doit marquer environ 30° au lactoscope.

2° La méthode de Donné a été simplifiée, est-il écrit, par Vogel (158) qui emploie une cuve en verre à parois fixes. On mélange 3 cm^3 de lait avec 100 cm^3 d'eau; on introduit le mélange dans la cuve et l'on observe dans un endroit sombre la flamme d'une bougie, placée à 1 m. Si elle est encore nettement visible, on ajoute du lait par ½ cm^3 jusqu'à ce qu'elle disparaisse. Un tableau empirique donne la teneur en graisse du lait analysé en fonction du nombre de cm^3 de lait employés pour réaliser l'obscurité. — Hoppe-Seyler (79) a modifié le procédé en ce sens qu'il opère toujours sur 1 cm^3 de lait auquel il ajoute de l'eau à la burette jusqu'à ce que le contour de la flamme apparaisse.

Seidlitz et Reischauer (51) emploient des cuves cunéiformes qui, déplacées devant une source lumineuse, produisent une absorption progressive. Des points de repère sur la cuve donnent l'épaisseur du liquide interposé et par suite la richesse en matière grasse.

3° Le *Lactoscope de Feser* (48) a l'avantage de permettre un contrôle optique du lait à la lumière du jour. Une éprouvette graduée de 200 cm³ porte, soudée à sa base et à son intérieur, une ampoule de verre close munie de traits noirs. On introduit 4 cm³ de lait dans l'appareil et l'on ajoute de l'eau jusqu'à ce que les traits gravés sur l'ampoule deviennent visibles. En face de la graduation indiquant la quantité d'eau ajoutée, on lit la teneur en « beurre » du lait essayé.

4° Le *Miroir de Heusner* (68). — L'auteur compare dans une sorte de miroir creux le lait en question, sous une épaisseur de 2 mm, avec un verre dépoli type correspondant à l'opacité du lait de la dernière qualité tolérée.

B. Méthode réfractométrique de Wollny

L'indice de réfraction d'une solution, tout comme sa densité, est fonction de la concentration de la substance dissoute: tel est le principe de la méthode. — 30 cm³ de lait sont agités dans un flacon émeri avec 3 cm³ d'une solution alcaline et glycérinée d'hydrate cuivrique ; on y ajoute de l'éther et l'on centrifuge après avoir agité pendant un quart d'heure. La solution éthérée est alors observée au réfractomètre spécial que l'auteur a construit pour cette détermination. (L'appareil rappelle le Butyro-réfractomètre de Zeiss.) L'indice de réfraction lui permet de calculer la teneur en matières grasses du lait. Du reste, Wollny a établi empiriquement une table de correspondance et une table de correction au cas où la température de la détermination diffère de 17°, 5, qui est la température étalon, obtenue par un dispositif de circulation d'eau. — Baier et Neumann ont perfectionné le procédé de Wollny.

V. METHODES INDIRECTES PAR CALCUL

La densité du lait est la résultante algébrique de deux influences antagonistes. En effet, la caséine, le lactose et les sels tendent à faire augmenter le poids spécifique, tandis que le beurre, plus léger que l'eau, tend à le faire baisser. On peut donc écrire :

$$\text{densité} = 1 - k\,(\text{beurre}) + k'\,(\text{extrait dégraissé})$$

k et k' étant des coefficients de proportionnalité. — Or, si l'on arrive à déterminer empiriquement ces facteurs, l'on pourra cal-

culer, grâce à cette équation, la teneur en lipides d'un lait, connaissant sa densité et son extrait sec. — C'est ce qui a été tenté par de nombreux auteurs [1].

1° Clausnitzer et Mayer (37) ont trouvé que:
1 gr. d'extrait sec fait augmenter la densité du lait de 0,00375
tandis que 1 gr. de beurre la fait diminuer de 0,001
On a donc: d = 1 + (E — B). 0,00375 — B. 0,001;
E = Extrait;
B = Beurre;
d'où les auteurs tirent la formule suivante pour le calcul de la teneur en matière grasse d'un lait:

$$B = 0{,}789.\ E - \left(\frac{d - 1}{0{,}00475}\right)$$

2° Se basant sur des considérations analogues, Fleischmann (50) donna, quelques années plus tard, l'équation suivante :

$$B = 0{,}833.\ E - 2{,}22\left(\frac{100\ d - 100}{d}\right)$$

3° Des formules plus simples ont été données par:
Pierre (114): B = 0,84. E — 222 (d — 1), et par
Halenke et Möslinger (65):

$$B = 0{,}8.\ E - \frac{d'}{5}$$

d' étant les degrés lus au lactodensimètre, c'est-à-dire la deuxième et troisième décimale de la densité.

VI. MICROMETHODES

Parmi les méthodes récentes préconisées pour la détermination des lipides du lait, il convient de citer les procédés microchimiques, qui ne nécessitent que des prises d'essai faibles et qui permettent de réaliser des économies sensibles sur les réactifs et la verrerie.

[1] Kayser 1877; Behrend et Morgen 1879; Hehener 1882; Richmond 1888; Quesneville 1884; Vieth 1888; Bourcart 1889; Gerber 1895; Babcock 1896; Ambühl 1889; Leys 1904; Dernichel 1904; Herz 1909; Codex alimentaire hollandais 1907; Giribaldo et Peluffo 1909; Comp.: Dr Koestler et Dr Dakke, le contenu des matières solides du lait calculé et trouvé analytiquement. *Le Lait*, 1923, 3, 112 et 200.

Nous mentionnerons en premier lieu la *méthode néphélométrique de Bloor* (18) qui s'apparente aux méthodes optiques : 1 cm³ de lait est épuisé à chaud par un mélange de trois parties d'alcool et d'une partie d'éther. On filtre: 5 cm³ du filtrat sont versés dans 100 cm³ d'eau distillée, on y ajoute 10 cm³ d'acide chlorhydrique à 10 % et l'on compare le louche produit avec celui d'une solution type de trioléine traitée de la même manière.

En 1922, H. Luhrig (93) préconisa, pour des raisons d'économie, tout un système de microméthodes destinées à permettre une analyse complète du lait sur une prise d'essai de 50 cm³. De l'ensemble des 8 procédés donnés par l'auteur, nous ne signalerons que ce qui a trait à la détermination du beurre dans le lait. La technique proposée est une réduction de celle de Röse-Gottlieb: à 1 cm³ de lait on ajoute successivement 0,4 cm³ d'ammoniaque concentrée, 1 à 2 cm³ d'alcool fort, 5 cm³ d'ether et 5 cm³ d'éther de pétrole. Après agitation, on décante la couche éthérée et on pèse le résidu obtenu par évaporation. Comparé à la macrométhode, dont il dérive, le « Micro-Röse » donne des résultats satisfaisants.

Tout récemment, MM. Polonovski et Lespagnol (115), au cours d'une étude sur les glucides du lait de femme, ont proposé pour le dosage des lipides la semi-micro-méthode suivante: On précipite les protides de 1 cm³ de lait par de l'acide silicotungstique. Le précipité qui se forme dans ces conditions englobe la totalité du beurre; on le filtre sur amiante en s'aidant du vide. Après les lavages convenables, il est épuisé par de l'éther de pétrole bouillant. La solution pétrolique est évaporée à siccité et le résidu donne par simple pesée ou par oxydation chromique la richesse en lipides du lait analysé.

CHAPITRE III.

ETUDE CRITIQUE ET RECHERCHES PERSONNELLES

> Quand on lit dans un ouvrage d'agriculture qu'un lait a fourni telle quantité de beurre par le battage, on se demande combien ce même lait eût produit de beurre pur par l'analyse chimique.
>
> (T. A. Quevenne: *Mémoire sur le lait. Ann. Hyg. publ.* 1841).

La question que se posait, il y a près de cent ans, un des premiers analystes du lait n'a pas perdu jusqu'à ce jour de son intérêt et la multitude même des procédés qui ont été préconisés pour le dosage des lipides du lait semble prouver implicitement qu'aucun d'eux n'est parfait. Aussi la critique en est facile, encore faut-il, avant tout, limiter le point de vue auquel on se place.

Quand on consulte la littérature à ce sujet, l'on voit que les auteurs considèrent le plus souvent les avantages matériels de tel ou tel procédé. Ainsi les défenseurs de la *méthode de Hoyberg* (72) font valoir que cette méthode présente par rapport à celle de Gerber (57) les avantages suivants:

suppression de la centrifugeuse, donc économie;

— l'alcool amylique malodorant;

— l'acide sulfurique ruinant les vêtements de l'opérateur;

— la température élevée, d'où manipulation plus facile.

Il apparaît donc bien que la méthode de Hoyberg est plus économique et d'un maniement plus agréable, encore que certains auteurs (96), lui reprochant qu' « elle est liée à une spéculation commerciale » (verrerie et réactifs spéciaux couverts par un brevet), ont trouvé un procédé analogue qui permet de réaliser un centime (!) d'économie par détermination. D'un autre côté, lors de dosages comparés par différentes méthodes analytiques, la plupart des chercheurs donnent la préférence à la méthode qui fournit constamment des résultats supérieurs par rap-

port à la méthode de base, sans se préoccuper si ce plus correspond réellement à un excédent de matière grasse extraite. Cela s'explique par le fait que le procédé analytique donnant les chiffres les plus élevés est assuré d'avance de la faveur du producteur qui vend le plus souvent son lait d'après la teneur en lipides. — Ce n'est donc pas le côté pratique et commercial que nous envisagerons dans cette étude critique, sans vouloir par là nier son importance, — mais plutôt l'aspect purement scientifique du problème.

Quelle est, dans ces conditions, la valeur des résultats que donnent les différentes méthodes analytiques exposées dans le précédent chapitre ?

Examinées sous cet angle, les méthodes de dosage peuvent se diviser en deux groupes: 1° les méthodes indirectes qui donnent les éléments d'un calcul plus ou moins compliqué pour la détermination des lipides; 2° les méthodes directes, toutes pondérales, qui donnent directement le poids des lipides contenus dans une prise d'essai.

I. ETUDE DES METHODES INDIRECTES

Nous laisserons délibérément de côté les méthodes indirectes proprement dites, qui permettent de calculer la teneur en beurre d'un lait, connaissant sa densité et son extrait sec.

Parmi les autres procédés indirects, les méthodes optiques sont certainement les moins exactes. Tout ce qui augmente l'opacité du lait examiné (substances étrangères ajoutées frauduleusement, bulles d'air), donne, en effet, le change sur la teneur réelle en beurre. De plus les résultats sont influencés par les variations de l'intensité lumineuse et par un facteur personnel non négligeable. La *méthode réfractométrique de Wollny* (102) est évidemment plus exacte, tout en étant passablement compliquée. Mais l'indice de réfraction du beurre, sur lequel le procédé se base, varie avec le climat, la température, les saisons, l'alimentation et l'époque de la lactation, ce qui nuit évidemment à l'exactitude de la méthode. — Tout comme l'indice de réfraction, la densité du beurre, elle aussi, est loin d'être une constante : elle varie en effet avec l'alimentation, les saisons et les races. De plus, la *méthode densimétrique de Soxhlet* (144) suppose, d'une part, que l'extraction des lipides par l'éther en milieu alcalin est

totale et, d'autre part, que seules des graisses passent dans l'éther à l'exclusion de toute autre substance, hypothèses qui ne sont pas définitivement démontrées.

Quant aux méthodes volumétriques, elles sont frappées d'une erreur commune: en effet, l'on détermine le poids des lipides par la relation élémentaire $P = d \times V$; or, si l'on peut mesurer en général assez exactement le volume de la graisse qui se sépare, il est par contre souvent impossible de connaître exactement sa densité, à moins de la déterminer directement. Du reste, cette densité est quelquefois tellement différente de celle du beurre correspondant que l'on s'est vu obligé de graduer empiriquement l'appareil de mesure. Quoi qu'il en soit, le dosage volumétrique reste donc toujours un dosage relatif. — Parmi ces procédés volumétriques, nous passerons sous silence les crémomètres qui n'ont plus qu'un intérêt historique, puisqu'on s'est rendu compte, dès le début, que « le volume de crème qui se sépare du lait est très variable suivant diverses circonstances ». Pour ce qui est des autres méthodes, nous examinerons les causes d'erreur de deux d'entre elles prises comme types: 1° la *méthode de Gerber* (57), type des méthodes par centrifugation et en milieu acide; 2° la *méthode de Hoyberg* (72), type des méthodes sans centrifugation et en milieu alcalin.

Que se passe-t-il au point de vue chimique dans un dosage de beurre d'après la *méthode de Gerber?*

L'acide sulfurique détruit l'émulsion de la graisse et dissout la caséine. La matière grasse qui se sépare passe pour être le «beurre» contenu dans la prise d'essai. Or, il n'en est rien. Au moment même où la graisse s'est séparée, on a, dans le butyromètre, un mélange de 3 composants: 1° la matière grasse et ce qui résulte de la matière grasse primitive; 2° l'acide sulfurique et les substances qui y sont dissoutes; 3° l'alcool amylique et les combinaisons qui en résultent.

La matière grasse est profondément modifiée, car Reiss (122) lui a trouvé une densité différente du beurre réel contenu dans l'échantillon à analyser (dans un cas, par exemple, on a 0,852 pour la graisse du Gerber et 0,822 pour le beurre vrai correspondant). — L'acide sulfurique attaque cette graisse (25 à 30 % des acides gras sont libérés, d'après Siegfeld (141) et en dis-

sout une partie, car si l'on introduit une quantité connue de graisse dans le butyromètre, on ne la retrouve jamais intégralement. Rœder a établi qu'avec 21 cm^3 d'acide sulfurique la graisse, passant dans l'acide (G), est égal à:

$$G = 0{,}01218\ g - 0{,}00148\ g^2$$

g étant la quantité de graisse employée. — L'alcool amylique est attaqué lui aussi par l'acide sulfurique: il se forme de l'amylène par déshydratation et oxydation (Siegfeld). D'autre part, une partie se combine aux acides gras libérés pour former des éthers amyliques: Ainsi modifié, l'alcool amylique est miscible avec la graisse et l'acide sulfurique et se partage donc entre les deux phases liquides. En outre, la hauteur de la couche butyreuse varie avec la vitesse de rotation des centrifugeuses (Hoyberg), et, de plus, entre la graisse et l'acide se place souvent un anneau noirâtre dû aux produits dissous provenant des bouchons de caoutchouc. La *méthode de Gerber* n'est donc qu'un procédé par compensation dépourvu de toute valeur absolue.

Il en est de même du *procédé de Hoyberg* et des autres méthodes volumétriques, avec cette différence que tout début de saponification entraîne ici irrémédiablement une erreur par défaut. En effet, si l'on peut admettre que, dans la *méthode de Gerber*, les acides gras libérés ou éthérifiés par l'alcool amylique passent dans la zone butyreuse, il est, par contre, établi que les savons qui se forment au cours des procédés alcalins restent en totalité dans la phase aqueuse.

II. ETUDE DES METHODES PONDERALES

Seules les méthodes pondérales peuvent prétendre à une exactitude absolue puisqu'elles donnent directement le poids de la matière grasse. Il ne s'ensuit pas toutefois qu'elles soient exemptes de toute cause d'erreur. — Il y a d'abord des sources d'erreur générales: 1° Les papiers filtres, les bouchons de liège, le coton cèdent des principes plus ou moins définis à l'éther. Voici les quantités d'extrait obtenus par différents auteurs:

Papier filtre	0,3 %	(Vieth)
Papier filtre dit « dégraissé »	0,025 %	—
Bouchon pulvérisé	3,5 à 5 %	(Siegfeld)
Coton	0,7 %	(Vieth)

Un appareil de Soxhlet témoin monté par Siegfeld avec deux bons bouchons et fonctionnant à blanc donna un résidu de 7,5 mgr. — 2° L'éther humide peut entraîner des substances non lipidiques.

Les anciennes méthodes au gypse, sable etc. avaient, en plus, le grave inconvénient de nécessiter un épuisement pour ainsi dire infini : 12 heures au minimum pour Gorodetzky (59), 15 jours au total pour le Dr Klein. Cela s'explique par le fait qu'au cours de la dessication une pellicule de caséine vient englober partiellement les globules gras, malgré la substance inerte interposée : dans ces conditions, l'éther arrive difficilement à dissoudre la totalité de la graisse. Aussi ces méthodes ne sont-elles plus guère utilisées de nos jours.

Les procédés basés sur l'épuisement du lait alcalin présentent les causes d'erreur suivantes:

1° Substances non grasses entraînées;

2° Graisse restée dans le sérum;

3° Graisse adhérente à l'appareil.

Les substances non lipidiques entraînées (lactose, matières azotées, chlorures) et la lécithine représentent de 2 à 3 mgr. par prise d'essai. Siegfeld en a trouvé 2,4 mgr. avec la *méthode de Röse-Gottlieb;* M. Pien et Mlle G. Maurice (98), opérant sur un lait écrémé, en ont dosé 3,2 mgr. avec la *méthode d'Adam* et 3,1 mgr. avec celle de Röse-Gottlieb. Cela constitue, pour un total de 300 mgr. de lipides, une erreur relative de 1 % environ.

Restent les procédés du type de la méthode officielle qui réalisent le dosage du beurre en partant d'un coagulum obtenu par précipitation de la caséine du lait, précipité qui entraîne la matière grasse. Ils reposent tous sur trois postulats qui demandent une vérification expérimentale:

1° Le coagulum renferme toutes les matières grasses du lait;

2° Le solvant employé épuise intégralement les matières grasses;

3° Le solvant employé n'épuise uniquement que les matières grasses.

III. RECHERCHES PERSONNELLES

Pour nous rendre compte si ces principes sont conformes à la réalité, nous nous sommes adressé à la méthode officielle elle-même, « admise par la Commission technique permanente du Ministère de l'Agriculture pour l'usage des Laboratoires d'Etat (Journal Officiel du 9 mars 1907) », méthode à laquelle nous avons comparé celle de KUMAGAWA-SUTO (80). Les travaux des chimistes japonais [KUMAGAWA, SUTO et INABA (73)] sur les tissus animaux et végétaux ont montré, en effet, que l'alcool bouillant est le meilleur solvant des lipides, sa puissance extractive étant deux fois plus forte que celle de l'éther ordinaire. Des recherches plus récentes de MM. TERROINE (147), LOBSTEIN (92) et de leurs élèves ont confirmé ces résultats. Il s'en suit que la méthode de KUMAGAWA-SUTO, modifiée par LEMELAND (85) constitue actuellement la méthode de choix pour l'extraction des lipides. Dans ces conditions, il nous a paru intéressant de l'appliquer au dosage des matières grasses dans le lait. A vrai dire, un tel essai a été fait, mais accessoirement et sans étude critique par MM. VLADESCO (157), PORCHER et MAYNARD (118). M. VLADESCO, appliquant au dosage de la graisse du lait un procédé de solubilisation de la matière organique au moyen de l'acide azotique, compare certains des résultats obtenus par sa méthode à ceux fournis par la méthode de KUMAGAWA. Mais l'auteur ne donne pas de détails ni sur la technique suivie ni sur la grandeur de l'erreur expérimentale pas plus du reste que sur l'interprétation des résultats analytiques. MM. PORCHER et MAYNARD sont plus explicites dans leurs recherches sur «la graisse du sang et la graisse du lait pendant la lactation». Ils emploient pour le dosage du beurre simultanément la méthode de MEILLÈRE et celle de KUMAGAWA qui leur permet « de séparer l'insaponifiable des acides gras ». Le poids des acides gras multiplié par 1.046, plus celui de l'insaponifiable (0,7 à 1,3 gr. p. 1000) leur donne « la matière grasse ». Les valeurs ainsi obtenues par les auteurs avec la méthode de KUMAGAWA sont toujours un peu plus basses, les différences assez constantes ne dépassant jamais 10 %. Toutefois, dans leur travail, cette comparaison, qui ne présentait du reste qu'un intérêt secondaire, demeure accessoire également.

Une étude spéciale, plus approfondie, restait donc à faire, de même qu'une comparaison avec la méthode officielle. En

outre, il nous a paru intéressant également de comparer avec les résultats ainsi fournis par la méthode de KUMAGAWA, ceux que donne l'extraction par l'alcool dans l'appareil de SOXHLET, où la température du solvant, dans le digesteur, ne dépasse pas 58°.

Au total,

1° étudier la valeur de la méthode officielle en soi;

2° comparer ses résultats à ceux de la méthode de KUMAGAWA;

3° voir si l'extraction alcoolique dans l'appareil de SOXHLET diffère beaucoup de cette dernière,

tel est l'objet de la première partie du présent travail.

A. Technique des méthodes employées

1. MÉTHODE OFFICIELLE. — Extraction par l'éther alcoolisé dans l'appareil de Soxhlet.

Comme nous l'avons rappelé dans le précédent chapitre, il existe en réalité deux méthodes officielles de dosage des matières grasses du lait. Nous n'avons fait porter nos essais que sur le procédé qui est le plus communément employé, à savoir celui par épuisement dans l'appareil de Soxhlet au moyen de l'éther éthylique alcoolisé.

En voici la technique:

Réactifs

1° Alcool à 95°;

2° Alcool à 35°;

3° Alcool à 65° acidifié au 1/1.000 par de l'acide acétique;

4° Ether éthylique à 65°.

Mode opératoire:

1° Placer dans un petit vase à précipité 25 cm^3 d'alcool acidifié. Mesurer exactement 10 cm^3 de lait, les verser dans le réactif précédent goutte à goutte, en agitant, au fur et à mesure, le mélange;

2° Après un quart d'heure de repos, filtrer le coagulum formé sur filtre taré de 11 cm. de diamètre, humecté préalablement avec de l'alcool; recueillir le liquide filtré dans une fiole jaugée de 100 cm^3;

3° Lorsque le filtre est égoutté, laver le vase à précipité à trois reprises différentes avec 10 cm³ d'alcool à 35°; on verse chaque fois les liquides alcooliques sur le filtre, en ayant soin de laisser égoutter celui-ci après chaque lavage; on termine en arrosant le filtre avec 10 cm³ d'alcool à 35° (tous ces liquides sont recueillis dans la fiole jaugée précédente et l'on complète le volume à 100 cm³ avec de l'eau distillée: la liqueur ainsi obtenue sert au dosage du lactose);

4° Essorer entre des doubles de papier buvard le filtre contenant le coagulum (beurre, caséine) et l'introduire dans l'appareil à épuisement de Soxhlet;

5° Verser sur le filtre 10 cm³ d'alcool à 95° en laissant le précipité s'humecter un instant;

6° Mettre dans le petit ballon taré de l'appareil 40 cm³ d'éther et faire l'épuisement comme de coutume en chauffant l'éther dans un bain d'eau à une température d'environ 40°;

7° L'épuisement terminé, détacher le ballon de l'appareil, chasser par distillation l'éther et l'alcool; le beurre qui reste est desséché à 100°; peser le ballon: la différence avec son poids primitif donne la quantité de beurre pour 10 cm³ de lait.

La méthode officielle n'indique pas la durée de l'épuisement: par uniformité avec la méthode de Kumagawa, nous l'avons fixée à huit heures.

II. Méthode d'extraction par l'alcool dans l'appareil de Soxhlet

L'épuisement a été fait par l'alcool à 95°, et sa durée a été également de 8 heures.

III. Méthode de Kumagawa-Suto, modifiée par Lemeland

Elle comporte la série d'opérations suivantes, rappelées dans leurs traits essentiels:

1° Epuisement du coagulum dans l'appareil de Kumagawa pendant 8 heures par l'alcool à 95°;

2° Evaporation du liquide extractif sous pression réduite et dessiccation à 50° dans le vide. Nous avons maintenu ce séjour dans le vide sulfurique à 50° pendant 15 heures;

3° Saponification de l'extrait total par 50 cm^3 de potasse alcoolique 2N pendant 2 heures au réfrigérant à reflux; on ajoute alors 45 à 50 cm^3 d'eau et l'on chauffe jusqu'à clarification complète (un quart d'heure);

4° Extraction de l'insaponifiable: la solution alcaline alcoolique est versée quantitativement dans une ampoule à décantation et épuisée à trois reprises par l'éther de pétrole (P.E. 50°—70°) en utilisant chaque fois 70 cm^3 de solvant. Les solutions éthérées réunies sont lavées avec 100 cm^3 d'eau, qu'il est préférable de rendre très légèrement alcaline (cette eau de lavage est ensuite ajoutée à la solution alcoolique restante), puis évaporées à sec sous pression réduite; on reprend par 10 cm^3 d'éther de pétrole sec (P.E. 50°), laisse reposer quelques heures et filtre sur amiante et sable dans un petit ballon taré. Le filtrat est évaporé dans le vide à la température ordinaire; le résidu de l'évaporation, qui représente l'*insaponifiable,* est desséché à 50°, également dans le vide, puis pesé.

A cause des substances volatiles qui composent en tout ou en partie l'insaponifiable, Lemeland recommande, d'une façon générale, de ne faire aucun desséchement à des températures dépassant 50°; il fixe à 1 heure la durée de la dessiccation, dans le vide, à 50°, de l'insaponifiable et aussi des acides gras; elle est censée assurer un desséchement complet; mais cela n'est pas, et nous l'avons prolongée au minimum 3 heures. [C'est la durée indiquée également par Belin (12)]. D'ailleurs, une telle dessiccation, poursuivie 3 heures, ne nous a pas donné un poids constant, et nous verrons, dans la discussion des résultats, les difficultés que soulèvent les constituants volatils de la matière grasse du lait.

5° Extraction des acides gras: La solution alcaline alcoolique provenant de l'extraction de l'insaponifiable additionnée de l'eau de lavage est acidifiée par 10 cm^3 d'acide chlorhydrique. Les acides gras libérés sont extraits par l'éther de pétrole, comme l'insaponifiable; le liquide éthéré est lavé à l'eau distillée pour enlever l'acide entraîné, puis traité comme la solution pétrolique d'insaponifiable: on obtient ainsi le *poids des acides gras;*

6° Calcul du poids des glycérides: Pour convertir en graisses neutres les acides gras, Kumagawa multiplie le poids de ceux-ci par le coefficient 1,046, qui représente le rapport entre le poids

moléculaire moyen de la trioléine, la tripalmitine, la tristéarine (soit 860,8) et celui des acides correspondants (soit 274,3 × 3 = 822,9).

Or, le poids moléculaire moyen des acides gras du lait est 231,7 (soit 231,7 × 3 = 695,1, puisqu'une molécule de glycérine correspond à 3 molécules d'acides gras), celui des glycérides correspondants est 733,1, ce qui donne le coefficient $\frac{733,1}{695,1} = 1,054$

Les extractions par l'alcool au Soxhlet et au Kumagawa ont porté sur des coagulums préparés, filtrés, lavés et essorés comme l'indique la méthode officielle. A cet effet, dans les essais que nous relatons, nous avons utilisé, non des cartouches, mais des filtres de même nature que celui employé dans la méthode officielle. Les coagulums soumis à l'épuisement se trouvaient donc en tout semblables dans les trois méthodes envisagées.

Dans les extraits totaux obtenus par la méthode officielle et par l'extraction alcoolique au Soxhlet, nous avons dosé les acides gras et l'insaponifiable selon la technique de Kumagawa et Lemeland. Et pour que la comparaison des méthodes fût plus rationnelle, nous avons, dans une série d'expériences, desséché les extraits totaux à 100° après distillation du solvant à la pression ordinaire, comme l'indique la méthode officielle; — et dans une autre série d'expériences, les extraits furent desséchés à 50° seulement, dans le vide sulfurique, pendant 15 heures, le solvant ayant été distillé sous pression réduite pour ne pas dépasser cette température, comme le prescrit la technique de Lemeland.

La méthode officielle ne fixe pas la durée de la dessiccation à 100° de l'extrait total ; peut-être est-il sous-entendu: « jusqu'à poids constant ». Nous l'avons, dans tous les cas, maintenue 3 heures.

Pour les acides gras, la durée de la dessiccation à 50° dans le vide sulfurique a varié de 3 heures à 12 heures. Elle fut même, dans une série d'essais, prolongée dans le vide sulfurique à la température ordinaire pendant 2 jours, puis la température fut portée à 100° pendant 3 heures.

Pour l'insaponifiable, la durée de la dessiccation à 50° dans le vide sulfurique fut de 3 heures, ainsi que nous l'avons indiqué précédemment, et dans certains cas, poussée jusqu'à 6 heures.

B. Recherches et résultats expérimentaux

Les résultats des divers dosages effectués selon les techniques indiquées sont réunies dans le tableau I.

TABLEAU I.

Poids comparés des extraits totaux, acides gras et insaponifiables, obtenus par l'éther alcoolisé dans l'appareil Soxhlet (Methode officielle) et par l'alcool dans les appareils Soxhlet et Kumagawa.

Echantillons de lait	Matières dosées et conditions de dessiccation	Extraction ethéroalcoolique (méth. officielle)		Extraction alcoolique		
				au Soxhlet		au Kumagawa
		Extrait desséché 3 h. à 100°	Extrait desséché dans le vide 15 h. à 50°	Extrait desséché 3 h. 100°	Extrait desséché dans le vide 15 h. à 50°	Extrait desséché dans le vide 15 h. à 50°
I	Extrait total	41,1	41,9	48,3	49,1	47,2
	Acides gras 3 h. dans vide à 50° .	36,0	36.8	35,4	35,8	37,7
	Acides gras 6 „ „ „ .	36.0	35,6	35,4	34,5	36,7
	Acides gras 12 „ „ „ .	36,0	35,0	35,2	34,1	36,1
	Insap.; 3 „ „ „ .	1,4	1,8	»	0,9	0,5
II	Extrait total	37,7	38,9	45,8	49,0	46,0
	Acides gras 3 h. dans vide à 50° .	32,4	33,4	32,0	33,0	34,7
	Acides gras 8 „ „ „ .	31,1	33,1	30,5	31,2	33,2
	Acides gras +24 „ „ à tempér. ordinaire . . .	30,9	32,6	30.4	31,0	33,0
	Acides gras + 3 h. à 100° . . .	30,0	31,5	29,3	30,2	32,0
	Insap.; 3 h. dans vide à 50°.	0,8	1,8	1,4	1,35	1.65
	Insap.; 6 „ „ „ .	0,45	1,5	1,15	0,95	1,35
III	Extrait total	35	36.8	38,2	39,3	36,9
	Acides gras 3 h. dans vide à 50°.	30,3	32,6	30,9	32.1	32,9
	Insap.: 3 „ „ „ .	0,55	0,65	0,9	2,0	0,35

Les résultats sont exprimés en grammes pour 1 litre de lait.

D'autre part, une vérification s'imposait: tous nos essais d'extraction ont porté sur le précipité obtenu en versant goutte à goutte 10 cm³ de lait parfaitement homogénéisé dans 25 cm³ d'alcool acétique à 65°, comme le prescrit la méthode officielle. La totalité de la matière grasse passe-t-elle dans le coagulum ainsi formé?

Nous avons évaporé à sec, à une température inférieure à 50°, le lactosérum mélangé à l'alcool acétique et les alcools de

lavage correspondant à 210 cm³ de lait. Le résidu a été épuisé à l'éther dans l'appareil de Soxhlet et nous en avons ainsi extrait 14 mgr. de matière éthérosoluble qui brunit à l'air. Ainsi l'alcool, tel qu'il est employé, dissout une petite quantité de matière grasse, contrairement aux affirmations de Bordas et Touplain (25). Ces auteurs écrivent en effet: « En ajoutant 10 cm³ de lait à 25 cm³ du réactif (alcool acétique), on obtient un mélange renfermant moins de 50 % d'alcool, quantité insuffisante pour dissoudre la moindre trace de beurre, celui-ci commençant seulement à se dissoudre dans de l'alcool à 60° et en proportion infime (0,02 de beurre pour 100 d'alcool à 60°). » Rapprochant le changement de teinte observé de l'instabilité des phosphatides, nous avons essayé de caractériser le phosphore par le molybdate d'ammoniaque après minéralisation. La réaction fut positive, mais ne révélait que des traces de phosphore. Cette partie éthérosoluble paraît donc être un mélange de graisses neutres et de lipoïdes. Elle est perdue pour le dosage. Toutefois, l'erreur que l'on commet en la négligeant est insignifiante: pour 1 litre de lait, la perte est de $\frac{14 \times 1.000}{210} = 66$ mgr., ce qui correspond à une erreur relative de $\frac{0.06 \times 100}{35} = 0{,}17$ %, en prenant 35 gr. comme teneur moyenne du lait en matières grasses

C. Discussion des résultats

I. Le solvant employé n'épuise-t-il que les matières grasses?

Quelle que soit la méthode d'extraction employée, si l'on multiplie le poids des acides gras par le facteur de Kumagawa corrigé, c'est-à-dire 1,054, pour avoir le poids des glycérides correspondants et si l'on ajoute au résultat le poids de l'insaponifiable, on obtient une somme inférieure au poids de l'extrait total. Cette différence peut être due:

1° soit à une erreur par excès dans la détermination de l'extrait total: substances non lipidiques entraînées;

2° soit à une erreur par défaut dans la détermination des acides gras et de l'insaponifiable.

Pour voir si l'extrait total renferme des substances autres que les graisses, nous avons traité par de l'éther un extrait pro-

venant de l'épuisement par l'alcool au Soxhlet. Dans le résidu insoluble dans l'éther, nous avons pu caractériser l'azote (caséine) et un sucre réducteur (lactose). Comment expliquer, dans l'extrait alcoolique, la présence de ces substances insolubles dans l'alcool pur?

Le lactose provient sans doute d'un lavage défectueux imputable à la méthode. En effet, l'on conçoit que le précipité de caséine englobant la matière grasse puisse retenir des traces de lactose que l'on ne peut enlever par des lavages à l'alcool à 35° à la température ordinaire. Ce lactose sera entraîné facilement par l'alcool faible imprégnant le coagulum (simplement essoré entre des doubles de papier buvard, comme l'indique la méthode officielle) au moment de l'extraction à chaud, voire par l'alcool à 95°, dans lequel il n'est pas rigoureusement insoluble à température élevée. La caséine est entraînée par l'alcool faible: elle passe à travers le filtre, donnant un liquide opalescent, qui précipite par l'alcool fort en flocons adhérents aux parois des ballons extracteurs.

Nous avons vérifié ces faits sur des coagulums dégraissés (provenant de 10 cm^3 de lait) de la façon suivante: Un coagulum, desséché dans le vide sulfurique, a été humecté avec 2 cm^3 d'alcool à 35°, puis épuisé au Soxhlet avec de l'alcool à 95° pendant une heure: il a donné 12 mgr. d'extrait renfermant de l'azote et réduisant la liqueur cupro-alcaline. Un deuxième coagulum sec a été épuisé directement avec de l'alcool à 95°: il a donné 8 mgr. de résidu également réducteur, mais dans lequel nous n'avons pu caractériser l'azote.

Pour éviter, au moins partiellement, ces causes d'erreur, il convient donc de dessécher les coagulums dans le vide sulfurique, ce qui fut réalisé dans les essais ultérieurs (tableau II).

Ces considérations s'appliquent également, quoique à un degré moindre, à la méthode officielle, où l'extraction est éthéro-alcoolique; nous avons constaté en effet, qu'au moment du premier siphonage, le liquide extractif est toujours plus ou moins opalescent et que l'extrait desséché à 100° présentait des points bruns. Villiers (156) avait d'ailleurs déjà noté un tel brunissement dans des essais sur la dessiccation du beurre: « A 110°, la caséine, dit-il, a bruni très sensiblement. » Cette altération commence même à 100°, comme nous avons pu le vérifier.

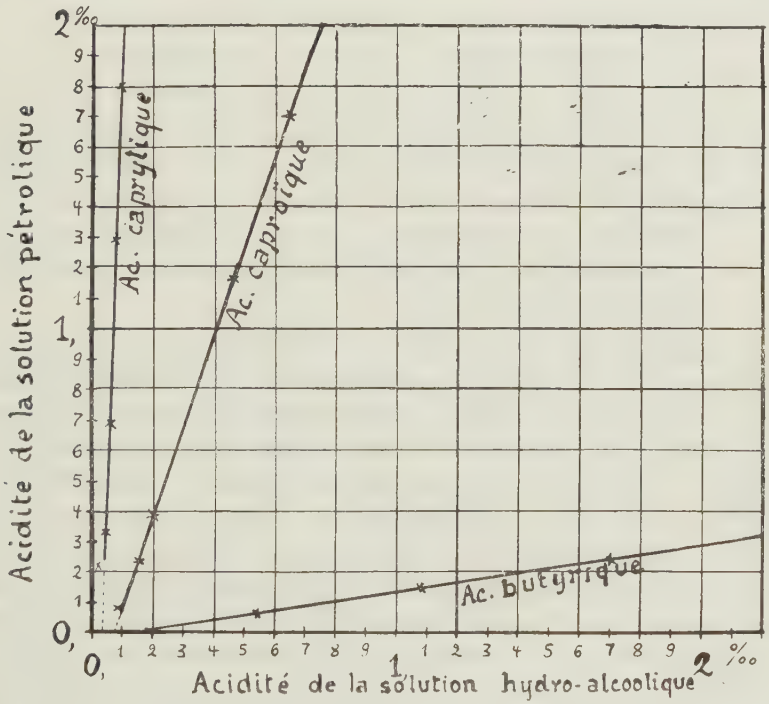
L'erreur par excès dans la détermination de l'extrait total n'exclut pas une erreur par défaut relative aux acides gras et à l'insaponifiable. La matière grasse du lait renferme en effet des acides gras solubles dans l'eau et des acides gras volatils. Comment ces acides vont-ils se comporter au moment de l'extraction par l'éther de pétrole, d'une part, et pendant la dessiccation, d'autre part?

II. Perte due a la solubilité de certains acides gras dans l'eau

Pour voir si, lors de l'épuisement à l'éther de pétrole, il y a perte d'acides gras solubles, nous les avons recherchés dans les liquides résiduels hydroalcooliques. Les liquides résiduels correspondant à 30 cm^3 de lait ont été neutralisés, puis concentrés à pression réduite jusqu'à un très faible volume (30 cm^3 environ). La masse trouble ainsi obtenue, acidifiée par de l'acide tartrique, a été soumise à une distillation au bain de sable: le distillat, dont nous avons recueilli 20 cm^3, avait une odeur de beurre rance; il était acide au rouge de méthyle et donnait, après neutralisation par l'ammoniaque diluée, un précipité amorphe avec l'azotate d'argent (caproate d'argent). Son acidité correspondait à 2 gr. 37 p. 1000 en acide butyrique, soit, pour 20 cm^3 de distillat (correspondant à 30 cm^3 de lait), 47 mgr. d'acides gras solubles (en acide butyrique). En supposant que la totalité des acides volatils ait distillé, la perte pour 10 cm^3 de lait atteint donc 15 mgr. environ, ce qui, sur un total de 350 mgr. d'acides gras (en considérant 35 gr. comme le poids moyen des matières grasses dans un litre de lait), équivaut à une erreur de 4,28 %. Mais cette proportion pêche certainement par défaut, d'autant que les acides gras classés comme fixes ne sont pas non plus rigoureusement insolubles. Du reste, il convient de signaler que de faibles quantités d'acides gras solides se sont condensés dans le réfrigérant ayant servi à la distillation. Evidemment, la solubilité dans l'alcool faible des acides gras inférieurs a été reconnue depuis fort longtemps: Dons (1908) (42) signale qu'à la température de 15°, l'alcool à 25° dissout les acides butyrique, caproïque, caprylique (0,2 %) et caprique (0,02 %). Mais l'on pouvait croire que l'éther de pétrole était capable de les extraire totalement de leur solution hydroalcoolique.

Nous avons donc étudié la répartition des acides butyrique, caproïque et caprylique entre l'alcool à 25° et l'éther de pétrole (P. E. 50°—70°). Pour ce faire, 50 cm³ d'une solution hydroalcoolique d'un des acides furent agités avec 50 cm³ d'éther de pétrole. L'acidité a été dosée dans les solutions hydroalcoolique et pétrolique avant et après agitation avec de la soude N/25 ou N/70 en présence de phénolphtaléine [1].

Les résultats obtenus ont été rassemblés dans un graphique.



Répartition des acides butyrique, caproïque et caprylique entre l'alcool à 25° et l'éther de pétrole.

Soit une solution hydroalcoolique d'acide gras de concentration z que l'on agite avec de l'éther de pétrole à trois re-

[1] Pour les solutions pétroliques nous avons opéré de la façon suivante: Dans une fiole d'Erlenmeyer on met en contact 20 cm³ de l'éther de pétrole en essai avec 10 cm³ d'eau distillée; on y ajoute 1 ou 2 gouttes d'une solution alcoolique de phénolphtaléine et l'on verse peu à peu la solution titrée, en agitant chaque fois vigoureusement. L'acide est neutralisé par la soude et le savon passe dans la phase hydroalcoolique. Au moment où la neutralisation est totale, un léger excès de soude fait virer la phénolphtaléine soluble dans l'alcool faible mais insoluble dans l'éther de pétrole.

prises: on obtient alors une solution pétrolique où l'acide a la concentration y et il reste une solution hydroalcoolique d'une concentration x.

$$z = x + y.$$

Si l'on étudie maintenant comment y varie en fonction de z, ou ce qui revient au même comment y varie en fonction de x, on aboutit à des relations simples représentées par des droites de formules:

$y = 0{,}16\ x - 0{,}03$ pour l'acide butyrique
$y = 3{,}2\ x - 0{,}24$ — caproïque
$y = 32\ x - 1$ — caprylique

Dans le cas d'un partage simple, la droite représentative passe par l'origine, la fonction étant du type $y = ax$, équation dans laquelle a désigne ce que l'on appelle « coefficient de partage ». Mais ici il y a un décalage vers l'axe des x, ce qui prouve qu'à un moment donné [1] les solutions aqueuses ne cèdent plus rien à l'éther de pétrole.

Cependant, il convient de faire remarquer qu'aux faibles concentrations la courbe représentative du partage pourrait s'écarter de la ligne droite par suite de phénomènes accessoires (dissociation électrolytique de l'acide en solution aqueuse, association moléculaire dans l'éther de pétrole, solubilité réciproque) qui commencent à jouer aux fortes dilutions. Nous n'avons pas pu vérifier cette hypothèse car les dosages acidimétriques d'acides faibles volatils sont peu précis s'il faut opérer avec des solutions titrées N/70 et cela d'autant plus que le CO^2 ne peut être éliminé par ébullition. Du reste aux concentrations notablement plus élevées il semble que l'on s'écarte également de la ligne droite pour aboutir à une forme parabolique. — Il restait en outre à étudier l'influence de la forte concentration en chlorure de potassium (7,4 gr. pour 200 cm^3 d'alcool à 25°) sur le coefficient de partage. L'expérience a montré que cette quantité de sel diminue la solubilité des acides gras dans l'alcool à 25° et augmente donc leur dissolution dans l'éther de pétrole. La différence n'a pas pu être évaluée exactement, car l'effet

[1] Quand $y=0$, x étant alors égal à
0,2 pour l'acide butyrique
0,075 pour l'acide caproïque
0,03 pour l'acide caprylique.

tampon du chlorure de potassium transforme le virage instantané de la phénolphtaléine en une zone de virage assez difficile à saisir.

Au total, comment les acides gras inférieurs vont-ils se comporter au moment de l'extraction par l'éther de pétrole ?

Supposons que, dans un dosage portant sur 10 cm³ de lait, la quantité d'acides gras mis en liberté soit égale à 350 mgr. Il y aura donc:

4,3 . 3,5 = 15 mgr. d'acide butyrique pour 200 cm³ d'alcool à 25°;

1,6 . 3,5 = 5,6 — caproïque pour 200 cm³ d'alcool à 25°;

1,2 . 3,5 = 4,2 — caprylique pour 200 cm³ d'alcool à 25°

ce qui fait pour mille

0,075 gr. d'acide butyrique
0,028 gr. d'acide caproïque
0,021 gr. d'acide caprylique.

Si l'extrapolation des droites est possible, les trois acides étudiés resteraient dissous dans l'alcool faible. Mais la présence du chlorure de potassium peut en faire passer de petites quantités dans l'éther de pétrole quoique les homologues supérieurs semblent abaisser la solubilité des acides gras inférieurs dans l'éther de pétrole comme le prouve l'essai suivant: 100 cm³ d'une solution hydroalcoolique d'acide butyrique à 0,56 p. 1000 sont agités avec 70 cm³ d'éther de pétrole renfermant 277 mgr. d'acides gras insolubles et fixes du beurre; 2,5 (au lieu de 10) % de l'acide butyrique en essai passent dans l'éther de pétrole. En définitive, les traces d'acides gras inférieurs qui se dissolvent dans l'éther de pétrole, en sont de nouveau extraites par le lavage ultérieur à l'eau distillée. On est donc en droit d'admettre que les acides butyrique, caproïque et caprylique sont à peu près totalement perdus pour le dosage.

III. Perte due a la volatilité des acides gras et de l'insaponifiable

En desséchant pendant 3 heures à 50° dans le vide sulfurique les acides gras obtenus dans nos essais, nous n'avons

jamais abouti à des poids rigoureusement constants, et cela à cause des acides gras volatils que le lait renferme. Au surplus, il n'existe pas une séparation stricte entre acides gras volatils et ceux qui ne le sont pas (142) et l'on ne saurait prétendre, dans un but d'étude, éliminer la totalité des acides volatils pour doser seulement les acides fixes: en effet, dans les conditions de dessiccation qui permettraient le départ total de ceux-là, une partie de certains de ceux-ci (acides laurique, myristique) se volatilise également (5). Le totum d'acides gras, ayant été pesé après 3 heures, puis après 6 heures, accuse entre les deux pesées une diminution de poids pouvant être de 3 à 5,5 %. Si l'on prolonge le séjour dans le vide de 6 heures à 8 et 12 heures à la température de 50°, la diminution se poursuit encore, quoique moins sensible et parfois pratiquement négligeable. Et si, après un séjour de 8 heures dans le vide sulfurique à 50°, on abandonne le totum d'acides gras pendant 24 heures dans le vide simplement à la température du laboratoire, son poids accuse encore une diminution ayant dans un cas atteint 1,5 %. Que les acides gras du lait se volatilisent ainsi peu à peu à la température de 50°, il fallait s'y attendre. Du reste, Villiers a montré que même les acides gras insolubles sont volatils à la température ordinaire dans le vide sulfurique.

En réalité, le phénomène est plus complexe, car les pertes de poids varient d'un échantillon à l'autre d'une façon tout à fait imprévue; cette différence semble être due à la superposition de deux volatilités : celle des acides gras inférieurs en solution dans leurs homologues supérieurs, et celle de l'eau; ces deux volatilités sont sensiblement égales, comme nous l'avons vérifié expérimentalement; mais le facteur variable est la quantité d'eau initiale, puisque les échantillons, tout en ayant été traités d'une façon analogue, n'aboutissent pas nécessairement à un produit de même degré d'humidité. On ne possède donc aucun critérium pour se rendre compte si la dessiccation est totale.

A vrai dire, il existe plusieurs méthodes de dosage de l'eau dans les acides gras: 1° Entrainement de l'eau par du xylène et

mesure volumétrique du distillat; 2° Détermination de l'indice d'acidité avant et après dessiccation au sulfate de soude anhydre; 3° Séchage à 100° dans un gaz inerte en présence d'une substance réductrice et dosage acidimétrique des acides gras volatils distillés : la différence entre la perte en poids et la quantité d'acides distillés donne le pourcentage d'humidité des acides gras en essai. — Les deux premières méthodes sont à rejeter dans le cas présent, car elles ne tiennent pas compte des acides gras volatils, ce qui fausserait les résultats. Seul le dernier procédé serait théoriquement applicable aux acides gras du lait, mais sa complexité le rend pratiquement inutilisable, surtout pour des quantités faibles d'acides gras où il aboutirait à des chiffres peu sûrs. Villiers croyait pouvoir dessécher convenablement des acides gras en les plaçant pendant 2 jours dans le vide sulfurique à la température ordinaire: ce procédé nous semble quelque peu illusoire, car la volatilité de traces d'eau au sein même d'une masse solide, aussi compacte qu'un gâteau d'acides gras, demeure incertaine.

Avec l'insaponifiable, dont le poids est d'ailleurs très faible et représente 2 à 5 % du poids des acides gras, même incertitude pour le critérium de dessiccation: si l'on prolonge son séjour dans le vide, à 50°, de 3 à 6 heures, on constate que son poids diminue dans des proportions allant de 16 à 44 %.

Au total, pour le dosage des acides gras et de l'insaponifiable du lait, le principe de la technique de Lemeland, à savoir « évaporation à sec dans le vide jusqu'à poids constant, sans jamais dépasser la température de 50° », ne peut donc être rigoureusement suivi et une détermination ayant une valeur absolue est impossible. Mais pratiquement, un séjour de 3 heures à 50° dans le vide paraît convenable.

Mettant à profit les résultats de ces premiers essais et les renseignements qu'ils nous ont fournis, nous avons effectué sur un même échantillon de lait une nouvelle série d'extractions,

avec les mêmes déterminations, en employant les trois méthodes précédemment indiquées.

La méthode officielle et l'extraction alcoolique au Soxhlet comportèrent comme précédemment deux séries de recherches : les unes portant sur des extraits totaux desséchés à 100° ; les autres sur des extraits totaux dont la température de dessiccation ne dépassa jamais 50°. Pour chaque détermination, il fut fait deux essais.

Les coagulums ont été desséchés dans le vide sulfurique pendant 24 heures à la température ordinaire: ils sont alors très hygroscopiques et l'on n'arrive pratiquement pas à les dessécher à poids constant.

Les acides gras et les insaponifiables ont été desséchés dans le vide sulfurique à 50° pendant 3 heures exactement, à compter du moment où les acides gras se liquéfient et non pas à partir du moment où l'étuve atteint 50°, car l'équilibre est lent à s'établir.

Enfin, puisque nous avons cherché à réduire au minimum les causes d'erreur ou d'imprécision, signalons-en une, d'ordre expérimental, et, du reste, légère: à l'origine, il y a une mesure volumétrique de 10 cm^3 de lait; on peut facilement faire ainsi des erreurs atteignant 1/10 de cm^3 du fait de la viscosité du lait, ce qui correspond à une erreur relative de 1 %. Pour obvier à cet inconvénient, nous avons pensé à remplacer la mesure par une pesée, soit du lait directement dans une pipette à robinet, soit du vase renfermant l'alcool acétique avant et après l'addition du lait. Le premier procédé a l'inconvénient de nécessiter un nettoyage de la pointe de la pipette, ce qui peut occasionner des pertes par capillarité. Quant au second, il est peu avantageux, étant donné la volatilité de l'alcool acétique: en 10 minutes, 25 cm^3 du réactif perdent 50 mgr. Nous nous sommes donc borné à mesurer les 10 cm^3 à la pipette et nous avons pris 4 minutes comme temps d'écoulement.

Les résultats obtenus dans cette nouvelle série d'extractions sont rassemblés dans le tableau II.

TABLEAU II

Poids comparés des extraits totaux, acides gras et insaponifiables obtenus par l'éther alcoolisé dans l'appareil Soxhlet (Méthode officielle) et par l'alcool dans les appareils Soxhlet et Kumagawa.

Matieres dosées	Extraction éthéro-alcoolique (méthode officielle)		Extraction alcoolique		
			au Soxhlet		au Kumagawa
	Extrait desséché 3 h. à 100°	Extrait desséché dans le vide 15 h. à 50°	Extrait desséché 3 h. à 100°	Extrait desséché dans le vide 15 h. à 50°	Extrait desséché dans le vide 15 h. à 50°
Extrait total	36,4	36,5	40,5	40,2	38,0
	36,1	36,3	39,7	39,2	(40,8)
Moyenne	*36,25*	*36,4*	*40,1*	*39,7*	*38*
Acides gras	30,2	31,6	33,2	32,8	33,1
	31,0	31,7	32,3	32.9	32,8
Moyenne	*30,6*	*31,65*	*32,75*	*32,85*	*32,95*
Insaponifiable	0,45	0,54	0,95	0,9	0,5
	0,3	0,6	1,2	0,7	0,6
Moyenne	*0,37*	*0,57*	*1,07*	*0,8*	*0,55*

Les acides gras et l'insaponifiable ont été uniformément desséchés 3 heures dans le vide sulfurique à 50°.

Les résultats sont exprimés en grammes pour 1 litre de lait.

Ces résultats permettent les remarques suivantes:

Si l'on considère les poids d'*extraits totaux*, la température de dessiccation (100° pendant 3 heures, ou 50° pendant 15 heures dans le vide sulfurique) ne paraît pas avoir grande influence, les écarts de poids constatés, pour une même méthode d'extraction, étant de l'ordre des erreurs expérimentales. Une constatation analogue avait pu être faite déjà dans la première série d'expériences (tableau I), en particulier pour les extraits de la méthode officielle. Mais, à température de dessiccation égale (50°), c'est l'extraction alcoolique qui donne le poids d'extrait le plus élevé, dépassant de 9 % celui de l'extrait obtenu par l'éther alcoolisé (méthode officielle); cela aussi avait été constaté, et même parfois d'une façon beaucoup plus accentuée, dans la précédente série d'expériences.

Sans présenter entre eux un tel écart, les poids des extraits alcooliques au Soxhlet se montrent en général plus élevés que ceux des extraits alcooliques au Kumagawa, l'alcool à la température de 58° enlevant vraisemblablement plus de caséine qu'à la température de 79°. (Le nombre de 40,8 obtenu dans un essai au Kumagawa semble dû à ce que l'extraction a été interrompue et réalisée en deux périodes de 4 heures: le coagulum macéra donc pendant un long temps dans l'alcool, ce qui augmenta la dissolution du lactose qui le souillait.)

En ce qui concerne les *acides gras,* leur poids apparaît un peu plus élevé, d'une façon générale, dans les extraits totaux dont la température de dessiccation n'a pas dépassé 50°, les autres conditions d'obtention des extraits étant les mêmes. Le fait était constant dans le tableau II pour la méthode officielle, mais l'écart demeure malgré tout de l'ordre des erreurs expérimentales. C'est la méthode de Kumagawa qui donne, dans tous les cas, le taux le plus élevé d'acides gras. Leur poids dépasse (dans le tableau II) de 7,6 % celui obtenu par la méthode officielle (cet écart se réduit à 4 % si l'extrait total, au lieu d'être desséché à 100°, comme il est prescrit, l'a été à une température ne dépassant pas 50°). L'extraction alcoolique au Soxhlet donne à 1 % près le même taux d'acides gras que le Kumagawa.

Quant à l'*insaponifiable,* son taux demeure très faible: 1,2 à 3 % d'acides gras. Les résultats du tableau II paraîtraient indiquer que c'est l'alcool au Soxhlet qui en extrait le plus: si, pour que la comparaison soit plus significative, on considère seulement l'insaponifiable des extraits desséchés à 50°, le poids de celui provenant de l'extraction alcoolique au Soxhlet est de 42 % supérieur aux poids des insaponifiables obtenus par la méthode officielle ou le Kumagawa. Mais cette supériorité ne s'était pas montrée constante dans la première série d'expériences (tableau I). D'autre part, dans la méthode officielle, l'extrait desséché à 50° donne un poids d'insaponifiable de beaucoup plus élevé que celui donné par l'extrait desséché à 100°, mais c'est l'inverse dans la méthode au Soxhlet-alcool; semblable discordance apparaît aussi dans les résultats du tableau I.

Comment expliquer ces écarts ? — L'insaponifiable du lait est constitué par un mélange de cholestérine libre et éthérifiée, de carotène, de savons et de substances volatiles de nature inconnue. La cholestérine étudiée surtout dans le beurre par de

nombreux auteurs [Salkowski (133), Bömer (22), Kirsten (74), Levy et Klein (88), Klostermann et Opitz (78), Berg (14)] a été dosée dans le lait par Wacker et Beck (11) (0,125 gr. p. 1000), Fox et Gardner (54) (1,151 gr. p. 1000), Dorlencourt et Palfy (43) (0,210 gr. p. 1000) et Salgues (132) (0,190 gr. p. 1000). Nous même avons précipité la cholestérine à l'état de stérol-digitonine; nous en avons trouvé 0,216 gr. pour 1 litre de lait ou 27 % de l'insaponifiable total. Le reste est représenté par du carotène dont l'importance pondérale est cependant négligeable, et par des savons que l'on retrouve d'une façon constante mais en quantité variable dans l'insaponifiable total, ainsi que l'a montré Lemeland (85). De plus le beurre, comme les graisses en général, renferme des substances insaponifiables volatiles peu connues, ce qui pourrait expliquer au moins partiellement les différences observées entre plusieurs dosages. Du reste, MM. Porcher et Maynard (118) trouvent également des valeurs d'insaponifiable variant entre 0,7 et 1,3 gr. au litre sans que la cause de cette variation apparaisse d'une façon nette.

Si l'on transforme en graisses neutres les acides gras (en les multipliant par le coefficient 1,054) et si l'on ajoute à la valeur ainsi obtenue le chiffre de l'insaponifiable, puis si l'on soustrait cette somme du poids de l'extrait total correspondant, on obtient les différences suivantes:

Modes d'extraction	Extrait total	Graisses (acides gras X 1,054)	Insapo-nifiable	Somme Graisses + Insapo-nifiable	Extrait tota — Graisses + Insapo-nifiable
Méthode officielle	36,25	32,25	0,37	32,62	3,63
Méthode de Kumagawa	38	34,73	0,55	35,27	2,73

Ainsi, avec la méthode officielle stricte (dessiccation à 100°), il manque 3 gr. 63 pour fermer l'analyse. Or, comme la somme des acides gras solubles et volatils perdus dans le dosage n'atteint pas 10 %, on a une preuve de plus que l'extrait total est impur.

Avec la méthode de Kumagawa, la différence atteint 2 gr. 73. Contrairement à ce que nous avions *a priori* espéré, on ne peut donc pas considérer l'extrait total de Kumagawa comme représentant le poids des glycérides purs.

Pour voir si la supériorité du Kumagawa ne s'explique pas, au moins partiellement, par une oxydation de la matière grasse,

due à la température plus élevée du solvant, nous avons déterminé l'indice d'iode (méthode de Wijs) des acides gras obtenus dans les divers modes d'extraction; voici les résultats:

Modes d'extraction	Température de dessiccation de l'extrait	Indice d'iode des acides gras
Extraction éthéro-alcoolique (méthode officielle)	100°	39,4
	50°	39,8
Extraction alcoolique au Soxhlet	100°	39,6
	50°	39,7
Extraction alcoolique au Kumagawa	50°	38,5

Ce sont les acides gras obtenus par la méthode de Kumagawa qui ont l'indice le plus bas; mais la différence avec la méthode officielle dépasse à peine une unité, de sorte que l'erreur due à l'oxydation éventuelle est négligeable.

Enfin, si l'on compare maintenant le poids de l'extrait total obtenu par la méthode officielle (et qui est donné comme représentant le poids du beurre) avec la somme graisses neutres + insaponifiable obtenue après extraction alcoolique au Kumagawa (tableau III), on voit que par compensation d'erreurs, — d'une part présence de substances étrangères dans l'extrait, d'autre part perte d'acides gras solubles et volatils en appliquant la technique de Kumagawa et Lemeland. — l'écart est faible et n'atteint jamais 1 gramme pour 1 litre de lait.

TABLEAU III

Différence entre l'extrait total de la méthode officielle et la somme graisses + insaponifiable donnée par la méthode de Kumagawa.

Méthode officielle Extrait total	Méthode de Kumagawa			Différence entre l'Extrait de la méthode officielle et la somme Graisses + Insaponifiable
	Graisses (acides gras X 1.054)	Insaponifiable	Somme Graisses + Insaponifiable	
	1re série d'expériences			
I. 41,1	39,73	0,5	40.23	— 0.87
II. 37,7	36,67	1,65	38,32	+ 0,62
III. 35,0	34,67	0,35	35,02	0
	2e série d'expérience			
36,25	34,73	0 55	35,27	— 0,98

Les résultats sont exprimés en grammes pour 1 litre de lait.

IV. CONCLUSIONS

I. Méthode officielle

1° L'essorage du coagulum, procédé peu scientifique et mal défini, est à rejeter: nous l'avons remplacé par une dessiccation de 24 heures dans le vide sulfurique à la température ordinaire.

2° Le temps d'extraction, qui n'est pas indiqué, a été fixé dans nos expériences à 8 heures, mais peut être limité à 4 heures, comme nous l'avons vérifié.

3° La durée de la dessiccation à 100° doit être de 3 heures.

4° L'extrait total n'est pas constitué par des glycérides purs: il renferme du lactose et de petites quantités de caséine, d'autant plus importantes que le coagulum est moins sec, d'où erreur en plus.

II. Méthode de Kumagawa

1° La supériorité de l'alcool chaud comme solvant extracteur des graisses se vérifie également pour le lait, la différence entre le poids des acides gras obtenus au Kumagawa et celui des acides gras extraits par l'éther alcoolisé dans la méthode officielle étant de 7 à 8 %.

2° Si le principe conserve toute sa valeur, il n'en est pas de même de l'application de la méthode. Seuls, les acides gras solides à partir de l'acide laurique sont dosés avec certitude. Pour le lait, il y a donc une perte de 5 % au moins, et pouvant aller jusqu'à près de 10 % si les conditions de dessiccation sont mal définies.

III. Méthode d'extraction alcoolique au Soxhlet

Elle donne des résultats très voisins de ceux de la méthode de Kumagawa, preuve que, dans cette dernière, c'est moins la différence de température qui entre en ligne de compte que le solvant employé.

Pratiquement, par compensation d'erreurs, la méthode officielle de dosage du beurre dans le lait est satisfaisante, et, en tout cas, la méthode de Kumagawa et Lemeland, en défaut dans ce dosage, aboutit à des résultats semblables.

DEUXIEME PARTIE.

Les phosphatides du lait.

CHAPITRE PREMIER.

HISTORIQUE

L'étude analytique des phosphatides du lait comporte deux problèmes essentiels:

1° un problème qualitatif,

2° un problème quantitatif.

C'est Tolmatscheff (152) qui, le premier, signala en 1867 la lécithine dans le lait, présence qui fut d'ailleurs niée par Schlossmann (135), puis par Njegovan (104). En 1905, Woods (161) caractérisa la céphaline par précipitation au moyen d'une solution ammoniacale d'acétate de plomb. Dix ans plus tard, Osborne et Wakeman (107) trouvèrent dans le lait: 1° une stéaryloleyl-lécithine; 2° de l'azote aminé (36 % de l'N total) ce qui corrobore l'existence de la céphaline signalée par Woods; 3° un diaminophosphatide devenant insoluble dans l'éther après précipitation par l'acétone, peu hygroscopique, fondant à 190°. Plus récemment, Bischoff (16), opérant sur la poudre de lait, y caractérisa la lécithine et la céphaline.

Au point de vue *qualitatif*, il semble donc à peu près établi que le lait renferme les trois phosphatides bien définis qui sont actuellement connus.

Quant au problème *quantitatif*, il est bien plus complexe. Il s'agit d'abord de connaître la teneur globale en phosphatides d'un lait moyen, puis les proportions relatives des trois phosphatides.

Pour doser la totalité des phosphatides du lait, deux séries d'essais ont été effectuées. La plupart des auteurs déterminent le Phosphore lipoïdique et le transforment en lécithine en le multipliant simplement par un facteur voisin de 25 (ce qui correspond à une richesse en phosphore de 4 %). Quelques

analystes ont cependant essayé d'isoler quantitativement les phosphatides non modifiés du lait.

Les méthodes qui ont été préconisées pour *le dosage du Phosphore lipoïdique* dans le lait diffèrent notablement entre elles, tant par le mode opératoire que par les résultats auxquels on aboutit.

La méthode de Stoklasa (146), la plus ancienne, consiste à évaporer le lait jusqu'à siccité et à épuiser le résidu par un mélange d'alcool et d'éther. Dans l'extrait éthéro-alcoolique, on dose le Phosphore après minéralisation. Cette méthode a été légèrement modifiée par Glikin (58) qui fait des épuisements à l'alcool et au chloroforme.

Comme la dessication du lait présente des difficultés et soulève des objections nombreuses, la majorité des auteurs ont eu recours à la précipitation du lait par l'alcool pur ou mélangé à d'autres substances. L'alcool pur a été employé par Woods (161): 100 cm^3 de lait sont portés à l'ébullition avec 200 cm^3 d'alcool pendant une demi-heure. Le coagulum est alors épuisé deux fois par de l'alcool. Les filtrats alcooliques réunis sont évaporés à sec au bain-marie; le résidu, repris par de l'éther chaud, sert à doser le phosphore après séparation de la lécithine et de la céphaline par une solution ammoniacale d'acétate de plomb. L'auteur trouve ainsi dans le lait de vache en moyenne 800 mgr. de phosphatides p. 1000. Nerking et Haensel (62) précipitent le lait d'une façon semblable, mais ils emploient, pour l'extraction, du chloroforme et non de l'éther. Leur moyenne pour un litre de lait de vache est égale à 620 mgr.; ils observent cependant des variations considérables d'un échantillon à l'autre (minimum 360 mgr.; maximum 1 gr. 16). Par la précipitation alcoolique simple, le phosphore lipoïdique passe à la fois dans le filtrat et le coagulum. L'adjonction de l'éther facilite la solubilisation des lipoïdes et, par suite, leur entraînement dans le filtrat. Burow (32) précipite le lait par le mélange suivant:

alcool
éther à parties égales 200 cm^3
acide acétique 30 % .... V gouttes.

Après un repos de 24 heures, il filtre, puis il épuise à l'éther le coagulum et le filtrat évaporé à sec. Dans l'extrait éthéré, il

dose le phosphore. D'après Brodrick-Pittard (31), tous les phosphatides passent dans la solution éthéro-alcoolique de sorte que l'épuisement du coagulum serait superflu. Aussi cet auteur se contente-t-il d'évaporer le filtrat dans un thermostat pour le reprendre par du chloroforme en presence de sulfate de soude et d'y doser le phosphore. Tandis que Burow trouve en moyenne 540 mgr. de phosphatides pour un litre de lait, Brodrick-Pittard n'en dose que 300 mgr.

Le principe de l'extraction éthéro-alcoolique a été transposé dans le domaine de la microanalyse par Hess et Helmann (67). Ces auteurs, employant la méthode d'extraction de Bloor (19), réalisent la séparation des phosphatides en versant 5 cm^3 de lait dans 95 cm^3 d'un mélange d'alcool et d'éther (3+1). Après un chauffage de 2 minutes, on filtre et l'on dose le phosphore dans le filtrat. Avec cette méthode, Hess et Helmann ont trouvé de 5,3 à 7 mgr. de P lipoïdique pour 100 gr. de lait, ce qui correspond à une teneur de 1,3 à 1,7 gr. de phosphatides par litre de lait, chiffre record qui dépasse largement tous les résultats obtenus jusqu'à présent. — Les recherches de Njegovan (104) aboutirent à des conclusions diamétralement opposées. En effet, d'après cet auteur, le phosphore éthéro-soluble qui passe dans l'extrait alcoolique serait dû à de petites quantités de caséine ou de ses produits de décomposition, la caséine étant légèrement soluble dans l'alcool absolu chaud.

Le dosage de la « lécithine » dans le lait, envisagé en France par Bordas et Raczkowski (26) repose sur un procédé rapide et original. On verse le lait dans de l'alcool dilué à 50° et acidifié par de l'acide acétique. Après filtration, le coagulum est épuisé avec de l'alcool absolu chaud. Les fractions alcooliques réunies sont reprises par de l'éther, et l'extrait éthéré est saponifié par la potasse. On libère les acides gras par l'acide nitrique et l'on dose le phosphore de l'acide glycérophosphorique restant. Cette méthode donne les résultats suivants:

	Lécithine p. 1000
Lait	0,58
Lait écrémé ..	0,18
Crème	3,34

Sachant que 3,2 l. de lait donnent 2,8 l. de lait écrémé et 0.37 l. de crème, les auteurs en concluent que l'écrémage enlève au lait 98 % des graisses neutres et 69 % de la lécithine.

A côté de ces procédés de dosage du phosphore lipoïdique qui s'adressent au lait préalablement desséché ou coagulé, il en est d'autres où l'on opère sur les phosphatides qui, libérés par alcalinisation du lait, ont passé dans l'éther ou l'éther de pétrole. — Ainsi Chapman (33) a eu l'idée de doser le phosphore dans le « beurre » extrait par la méthode de Röse-Gottlieb; il en a trouvé 1,6 % (en lécithine) de l'extrait éthéré, ce qui fait 640 mgr. de phosphatides pour 1 litre de lait si l'on estime à 40 gr. la quantité moyenne de lipides par litre de lait. Les dosages effectués sur les extraits éthérés de la crème, du lait écrémé et du babeurre, ont donné les résultats suivants (exprimés en lécithine et rapportés à 100 gr. de l'extrait éthéré correspondant):

Lait	1,6 %
Crème	0,43 %
Lait écrémé	10,78 %
Babeurre ..	20,25 %

Il en résulte que le beurre, contrairement aux affirmations de Bordas et Raczkowski, renferme au plus un dixième des phosphatides du lait dont il provient, les 9/10 restant dans le lait écrémé et le babeurre. A remarquer également que, d'après Chapman, les matières grasses du babeurre renferment un cinquième de lécithine, et d'après Thurston et Petersen (112), elles en contiendraient jusqu'à 50 %. D'autre part, J. Pien et Mlle G. Maurice (98) ont trouvé sur un lait écrémé, et ne renfermant que 2,4 p. 1000 de lipides, 222 mgr. de phosphatides dans l'extrait obtenu d'après la *méthode d'Adam* et 214 mgr. dans celui obtenu par la *méthode de Röse-Gottlieb*, ce qui fait une teneur relative de 9,2 % (Chapman en trouve 10,7 %).

Si l'on envisage donc le problème quantitatif de la richesse du lait en phosphatides et si on se limite aux différents dosages

de phosphore lipoïdique effectués, on arrive à la conclusion que le lait renferme en moyenne 622 mgr. de phosphatides par litre.

Woods	800 mgr.
Nerking et Haensel	620 —
Burow	540 —
Brodrik-Pittard	300 —
Hess et Helmann	1500 —
Njegovan	0 —
Bordas et Raczkowski	580 —
Chapman	640 —
	4980 : 8 = 622,5

Mais il convient de souligner que cette moyenne résulte de données fort différentes, les extrêmes étant 0 et 1500.

Aussi certains auteurs ont-ils essayé *d'isoler quantitativement les phosphatides du lait.* Le principal essai dans ce sens a été fait par Osborne et Wakeman (107) que nous avons déjà cités. Voici brièvement résumés les différents résultats de leurs recherches:

1° Les auteurs commencent par débarrasser le lait de son beurre par centrifugation. La caséine est alors précipitée par l'addition de 1 % d'acide chlorhydrique; le coagulum, filtré sur toile, est desséché à la presse hydraulique puis mis à digérer à plusieurs reprises avec de l'alcool anhydre. La solution alcoolique, ainsi obtenue, est évaporée à sec, reprise par de l'éther et versée dans de l'acétone. Le précipité qui se forme est repris par de l'éther. La partie restée insoluble a les propriétés d'un diaminophosphatide. La fraction éthéro-soluble est reprécipitée par l'acétone. Le précipité lavé à l'acétone et séché donne à l'analyse 3,53 % de phosphore et sa teneur en azote laisse supposer que c'est un mélange de diaminophosphatide et de monoaminophosphatide. Le rendement est égal dans ces conditions à 0,043 gr. de phosphatides pour 100 gr. de coagulum.

2° D'autre part le filtrat obtenu après séparation de la caséine, et qui renferme comme l'on sait la lactalbumine et la lactoglobuline, est porté à l'ébullition pendant cinq minutes. Le précipité qui se forme est d'abord lavé à l'eau, puis desséché et épuisé à l'alcool, comme la caséine. L'extrait alcoolique concentré

est repris par de l'éther. Après évaporation de l'éther, les auteurs obtiennent un résidu qui, traité par de l'acétone, donne un précipité qui n'est que partiellement soluble dans l'éther. La fraction insoluble a les propriétés d'un diaminophosphatide (P/N=1/2,09) et cristallise à partir de l'alcool en donnant un produit dont le point de fusion est égal à 184°. La fraction insoluble dans l'acétone mais soluble dans l'éther donne un rapport N/P=1,01; c'est une poudre brunâtre qui, après purification, présente les caractéristiques suivantes: N=1,81 %, P=3,87 %, N/P=1/0,97. Elle est hydrolysée par la baryte avec formation de choline (40 % seulement du chiffre théorique), caractérisée par son chloroplatinate, de glycérophosphate de Ba (18,84 % ac. glycérophosphorique au lieu de 21,35 %) et de savons barytiques. Le pourcentage des acides gras obtenu est égal à 66,3 %. Les acides gras non saturés ont un indice d'iode de 85,7 donc voisin de celui de l'acide oléique. Les auteurs essayent alors l'hydrolyse acide par l'acide chlorhydrique à 2 % pendant six heures. Le résidu repris par de l'éther précipite encore par l'acétone: l'hydrolyse n'est donc pas complète; le précipité ainsi obtenu est chauffé de nouveau avec de l'acide chlorhydrique pendant deux heures et demie. Les liquides éthérés réunis donnent 74 % d'acides gras (au lieu de 66 % par hydrolyse barytique) avec un indice d'iode égal à 74,4. Les acides gras non saturés dont l'indice d'iode est égal à 87,2 représentent 85 % de la totalité des acides gras. Dans la solution restante les auteurs isolent la choline à l'état de chloroplatinate, mais ils y trouvent également de l'azote aminé (36 % de l'N total) par la méthode de Van Slyke. Et, détail important, le coagulum de lactalbumine et de lactoglobuline ne cède pas de phosphore à l'éther.

3° Quant au lait débarrassé du beurre, de la caséine et des protéines coagulables, il est neutralisé par de la soude en présence de phénolphtaléine. Le précipité qui se forme est épuisé par l'alcool et l'extrait alcoolique est repris par de l'éther. La solution éthérée versée dans de l'acétone donne un précipité à 3,57 % de Phosphore.

Il découle de cette étude que les phosphatides du lait sont entraînés par les protides et que le « beurre », le lactose et les sels ne retiennent pas de lipoïdes du tout. Les auteurs donnent

donc le tableau suivant pour la composition moyenne d'un litre de lait:

		Phosphatides entraînés
Graisses	35 gr.	0
Caséine	29	0,0102
Protides coagulables	4,7	0,0124
Précipité de neutralisation	4,6	0,0041
Lactose, sels, etc.	55,0	0
Total	128,3	0,0267

Le total des phosphatides obtenu par Osborne et Wakeman à partir de un litre de lait n'atteint donc pas 27 mgr. quoique les auteurs opérèrent sur des quantités très grandes de lait (60 à 3.000 litres).

En 1927, G. Bischoff (16), ignorant les travaux d'Osborne et Wakeman — car il déplore le « manque d'analyses qualitatives » — a tenté d'isoler les phosphatides à partir de la poudre de lait. 10 kg. de poudre de lait, correspondant à 80 litres de lait, sont traités, par portions sucessives, par de l'alcool à 96° au réfrigérant à reflux. L'extrait alcoolique est concentré à pression réduite dans un courant de CO^2. Le résidu est épuisé à nouveau par une quantité plus faible d'alcool. Le nouvel extrait alcoolique est alors évaporé à sec et épuisé à l'éther. Le produit éthérosoluble traité par l'alcool froid donne deux fractions: l'une, soluble dans l'alcool, constitue la « lécithine brute »; l'autre insoluble dans ce solvant, représente la « céphaline brute ». Les deux fractions sont purifiées par précipitation au moyen de l'acétone. L'auteur obtient ainsi, à partir de 80 litres de lait, 15 gr. de « lécithine impure » et 7 gr. de « céphaline impure ». La lécithine est alors émulsionnée avec de l'eau, puis précipitée par de l'acétone. L'opération répétée deux fois donne un produit à 3,3 % de phosphore et 2,56 % d'azote, dont un septième, c'est-à-dire 0,36 %, est de l'azote aminé. Bischoff y caractérise la choline à l'état de chloroplatinate. La céphaline impure donne 2,84 % de phosphore et 1,56 % d'azote, dont un tiers, c'est-à-dire 0,5 % représente l'azote aminé. L'aminoéthanol y est facilement décelable. Signalons en passant que l'auteur a également recher-

ché les phosphatides dans le beurre où il a trouvé 10 mgr. du complexe au chlorure de cadmium pour 100 gr. de beurre.

Au total, en ce qui concerne la quantité de phosphatides contenus dans le lait, les différents dosages du phosphore lipoïdique aboutissent à des résultats fort discordants dont la moyenne est voisine de 600 mgr. par litre de lait, tandis que les essais d'extraction quantitative donnent l'un 27 mgr. et l'autre 275 mgr. (phosphatides impurs?) p. 1000.

Dans ces conditions il semble quelque peu téméraire de vouloir établir les proportions relatives des trois phosphatides. Néanmoins nous ferons remarquer de suite que, contrairement à toute attente, il existe une concordance au moins partielle entre les données des deux auteurs qui ont abordé la question. En effet, d'après les chiffres d'Osborne et Wakeman, on peut calculer la répartition suivante:

37 % de lécithine
20 % de céphaline
43 % de sphingomyéline.

Pour Bischoff, qui passe sous silence la sphingomyéline, il y aurait:

68 % de lécithine
32 % de céphaline.

En se limitant aux monoaminophosphatides, on obtient donc :

64 % de lécithine et 36 % de céphaline pour Osborne et Wakeman

68 % de lécithine et 32 % de céphaline pour Bischoff.

L'étude des phosphatides du lait était donc à reprendre. En se plaçant sur le terrain purement analytique, il fallait:

1° expliquer les différences importantes signalées plus haut entre les divers dosages des phosphatides et surtout celles que l'on relève entre les déterminations du phosphore lipoïdique et l'extraction même des phosphatides;

2° chercher une méthode exacte de détermination du phosphore lipoïdique dans le lait;

3° mettre au point un procédé d'extraction à peu près quantitatif des phosphatides en vue de leur purification ultérieure; tel a été l'objet de la deuxième partie de ce travail.

Nous exposerons donc successivement:

a) quelques notions préliminaires sur le dosage, les critériums de pureté et l'hydrolyse des phosphatides;

b) les techniques employées et spécialement une méthode de microdosage du phosphore lipoïdique;

c) des essais comparatifs d'extraction des phosphatides en vue de ce dosage;

d) des essais de purification des phosphatides du lait.

CHAPITRE II.

GENERALITES SUR LES PHOSPHATIDES

Il n'existe pas de méthode d'extraction des phosphatides qui soit rigoureusement quantitative. On est donc obligé de recourir à des dosages indirects comme celui du phosphore lipoïdique. D'autre part pour se rendre compte de la pureté des phosphatides l'on se contente généralement de doser le phosphore et l'azote afin de pouvoir établir le rapport caractéristique N/P.

Voici les pourcentages de phosphore et d'azote des différents phosphatides:

	Phosphore	Azote	N/P
Lécithine	3,86	1,74	1
Céphaline	4,12	1,86	1
Sphingomyéline	3,87	3,49	2

Pour que la détermination du phosphore lipoïdique ait réellement la valeur d'un dosage indirect des phosphatides, il faut qu'elle s'effectue sur un extrait totalement dépourvu de toute autre substance phosphorée. Il en est de même de l'azote lipoïdique. Or ces conditions sont particulièrement difficiles à réaliser dans le cas du lait. Voici en effet la répartition du phosphore et de l'azote dans le lait de vache:

Répartition du phosphore dans le lait (en milligr. par litre) [1]

Phosphore total (916 mgr.):
- minéral (690 mgr.):
  - dissous: phosphates de K 400 mgr.
  - en suspension:
    - phosphates de Mg 40 „
    - phosphates de Ca 250 „
- organique: (226 mgr.) . .
  - caséine . . . . 210 „
  - lactoglobuline . 4 „
  - phosphatides . . 12 „
  - ethers phosphor. traces

[1] Ces chiffres sont en partie empruntés au travail de MM. Porcher et Chevallier sur « La répartition des matières salines dans le lait. » Le Phosphore des phosphatides est celui obtenu dans nos essais.

Répartition de l'azote dans le lait [1]

			(en gr. d' N par litre de lait.)
Protéines :	Caséine	30 gr.	4,68
	Lactalbumine .	4,5 „	0.70
	Lactoglobuline .	2 „	0,30
Acides aminés :	Glycocolle . . .	0,650 „	0,14
	Tyrosine . . .	0,090 „	
	Leucine	0,092 „	
	Ac. aspartique .	0,020 „	
	Ac. glutamique	0.054 „	
Urée		0,200 „	0.09
Purines :	Ac. urique . Hypoxanthine Xanthine . Adénine . . Guanine . .	0,017 „	0,005
Groupe de la Guanidine :	Créatine . . .	0,007 „	0,004
	Créatinine . . .	0,005 „	
Phosphatides		0,300 „	0,006

Il résulte de ces deux tableaux que le phosphore des phosphatides représente environ 1/75e du phosphore total, et l'azote des phosphatides environ 1/1000e de l'azote total. Cette disproportion explique, à notre avis, au moins partiellement, les nombreuses contradictions que l'on relève dans la littérature des phosphatides du lait. Il suffit qu'un coagulum soit mal lavé ou imparfaitement desséché pour qu'il cède à l'alcool ou à l'éther des substances phosphorées ou azotées étrangères aux lipoïdes. Pour effectuer un dosage de phosphore lipoïdique correct, la principale précaution à prendre consiste donc à éliminer le phosphore minéral et protéique.

La détermination de l'azote, effectuée suivant les mêmes directives, nous renseigne sur la proportion de diaminophosphatide, et celle de l'azote aminé nous donne le pourcentage de céphaline puisque les deux autres phosphatides ne renferment pas d'azote aminé libre.

---

[1] Pour établir la répartition de l'azote dans le lait, nous nous sommes basé sur trois études récentes:

Denis (W.) et Minot (A.S.). — Methods for the quantitative determination of the non protein nitrogenoud constituents of Milk. J. of biolog. Chem. 1919, t. 37, p. 353 et t. 38, p. 453.

Pichon-Vendeuil. — Sur les amino-acides du lait. B.S.P. 1921, t. 28, p. 361.

Bouchara (E.). — Précipitation des protides du lait. Thèse Doct. Pharm., Paris 1931.

Enfin nous nous sommes adressé à un troisième critérium de pureté: celui de la quantité d'acides gras obtenus par hydrolyse. La théorie prévoit:

70,1 % pour la lécithine
75,9 % pour la céphaline
43,4 % pour la sphingomyéline.

A vrai dire, ces quantités théoriques d'acides gras n'ont jamais pu être obtenues pratiquement, et là où les auteurs ont donné des chiffres très voisins, leur mode opératoire est visiblement en défaut. Ainsi Osborne et Wakeman (107) prétendent avoir trouvé 74 % d'acides gras pour les phosphatides du lait. Or la séparation des acides gras a été faite après hydrolyse acide au moyen de l'éther sulfurique qui, comme l'on sait, dissout également la glycérine, les phosphatides non hydrolysés et entraîne des substances solubles dans l'eau, s'il n'est pas rigoureusement anhydre. Que les acides gras ne précipitent plus par l'acétone, ainsi que l'affirment Osborne et Wakeman, cela ne veut pas dire qu'ils sont totalement dépourvus de phosphatides; il aurait été plus rationnel, à notre avis, d'y doser le phosphore. Le pourcentage d'acides gras trouvé par la majorité des auteurs oscille entre 57 et 64 pour les monoaminophosphatides. Ainsi E.-F. Terroine, Ch. Hatterer et P. Roehrig (148), dans une étude systématique des phosphatides animaux et végétaux, donnent des valeurs comprises entre 56,2 et 60,6 % et rappellent que Levene et West (87) ont obtenu 63,4 % d'acides gras pour la céphaline, alors que Mac Lean (95) trouve 64 pour la lécithine et 62 pour la céphaline retirées de la levure de bière.

Comment expliquer ce déficit?

Nous avons effectué quelques essais sur la lécithine commerciale dont voici les conclusions:

1° L'hydrolyse peut se faire avec de la potasse de concentration variable, depuis N/10 jusqu'à 2N; elle est possible à froid (24 heures avec KOH N/10) tout en étant plus rapide à chaud (2 heures avec KOH 2N).

2° L'hydrolyse acide est bien plus longue (minimum huit heures) par suite de l'insolubilité de la lécithine dans les liqueurs acides. De plus les acides gras surnageants sont davantage exposés à l'oxydation.

3° Quel que soit le procédé mis en œuvre pour extraire les acides gras des produits d'hydrolyse, nous n'avons jamais pu obtenir un taux d'acides gras supérieur à 63 %. Nous avons essayé d'une part la technique de LEMELAND (85), exposée dans la première partie de ce travail; d'autre part nous avons évaporé à sec, à basse température, le liquide résultant de la saponification et épuisé le résidu à l'éther de pétrole.

	Agent hydrolysant	Temps	Prise d'essai	Acides gras trouvés	Acides gras %
Hydrolyse alcaline:	KOH 2N à chaud	2 H	1,237	0,783	63,2
	— N/10 —	6 H	0,595	0,374	62,6
	— N/10 à froid	24 H	0,544	0,345	63,0
Hydrolyse acide:	HCl 2 N à chaud	8 H	0,650	0,380	58,4
	— 10 % —	8 H	0,508	0,310	61,0

4° Après dissolution des acides gras par de l'éther de pétrole léger il reste un produit brun insoluble. Nous l'avons recueilli sur un filtre à sable et constaté qu'il est pratiquement insoluble dans l'éther de pétrole, l'eau et l'éther sulfurique. Il se dissout par contre dans l'alcool et le chloroforme. Il représente 4 à 6 % de la lécithine en essai, renferme de faibles quantités de phosphore (environ 0,5 %) et possède un indice d'iode de l'ordre de 42. C'est vraisemblablement un produit d'hydrolyse plus ou moins oxydé de la lécithine, qui a perdu la propriété de se dissoudre dans l'éther. L'existence de ce corps ou de ce mélange explique peut-être, dans une certaine mesure, le déficit en acides gras. Voici d'autres arguments qui viennent à l'appui de cette hypothèse:

a) Quelques auteurs, en particulier BLOOR (20), ont constaté que d'une façon générale l'indice d'iode des acides gras est toujours plus bas que celui calculé théoriquement à partir de l'indice d'iode des phosphatides correspondants. La lécithine commerciale Poulenc qui a un indice d'iode de 64,9 devrait donner, par exemple, des acides gras à indice d'iode égal à 92; or en réalité les acides gras obtenus ont un indice d'iode de 65,3.

b) Si l'on met en corrélation le déficit en acides gras et la différence des indices d'iode, on peut en déduire que les 7 % qui manquent devraient avoir un indice d'iode de 330, donc voisin de celui de l'acide arachidonique, le plus oxydable des acides gras non saturés.

c) D'autre part, plus les phosphatides renferment d'acides gras non saturés, plus le rendement en acides gras est faible. Ainsi, d'après Terroine, Hatterer et Roehrig (148), les phosphatides de l'œuf de poule avec un indice d'iode de 103 donnent 59,5 % d'acides gras en moyenne et ceux de l'œuf de grenouille avec un indice d'iode de 142 donnent 58,1 %.

Quoi qu'il en soit, la pureté des phosphatides est à peu près certaine si l'azote, le phosphore et les acides gras sont dans un rapport très voisin de la théorie. Mais pratiquement une telle exactitude n'est pas toujours nécessaire. Ainsi l'on peut doser le phosphore des phosphatides en présence de graisses neutres et d'impuretés azotées, tout comme l'on peut étudier les acides gras des phosphatides obtenus par saponification des lipoïdes souillés de phosphore minéral ou d'azote protéique.

CHAPITRE III.

ETUDE D'UNE METHODE DE MICRODOSAGE DU PHOSPHORE LIPOIDIQUE

Pour suivre la marche de l'extraction des phosphatides du lait et leur purification par précipitation acétonique, il nous fallait une méthode de dosage du phosphore lipoïdique qui ne nécessite que des prises d'essai relativement faibles et qui puisse s'appliquer à des lipides dont la richesse en phosphore varie de 0,005 à 4 %. Nous avons adopté une méthode volumétrique, simple et rapide, préconisée par Mme Soerensen (143), puis modifiée par M. Macheboeuf (94), et qui n'est en somme que le Micro-Neumann appliqué au dosage du phosphore organique.

Le principe résumé de la méthode est le suivant:

1° Minéralisation sulfonitrique de la substance à analyser.

2° Précipitation du phosphore à l'état de phosphomolybdate d'ammonium.

3° Dissolution du précipité dans un excès de soude titrée que l'on dose en retour.

Quand nous avons essayé d'appliquer cette méthode aux matières grasses du lait, nous nous sommes heurté à un certain nombre de difficultés.

En effet les traités classiques indiquent que, pour un dosage de phosphore par le molybdate d'ammonium, il faut toujours se placer dans des conditions strictement identiques pour avoir des résultats comparables, donc:

même quantité de phosphore à doser

même concentration en nitrate d'ammonium

même concentration en molybdate d'ammonium, etc.,

car le précipité obtenu n'a pas une composition bien définie, un atome de phosphore pouvant s'unir au molybdène dans des proportions variant de 1/10 à 1/14 pour donner des complexes de formules suivantes:

$$14\ Mo\ O^3 + P\ O^4\ (N\ H^4)^3 + 4\ H^2O$$

$$12\ Mo\ O^3 + P\ O^4\ (N\ H^4)^3$$

$$[12\ Mo\ O^3 + P\ O^4\ (N\ H^4)^3 + 3/2\ H^2O]^2$$

$$[10\ Mo\ O^3 + P\ O^4\ (N\ H^4)^3 + 6\ H^2O]^2$$

Or si l'on a affaire à des substances plus ou moins riches en phosphore, il faut opérer sur des prises d'essai variables, pour avoir toujours une même quantité de phosphore à doser. Là commencent les difficultés, car des prises d'essai variables nécessitent forcément des quantités variables d'acides pour la minéralisation. Au cours de quelques essais préliminaires, nous avons remarqué que tantôt la minéralisation était laborieuse faute sans doute d'une quantité d'acide suffisante, tantôt le phosphomolybdate ne précipitait pas; tantôt les résultats de trois dosages, où l'on devait avoir, par exemple, dosage 3 = dosage 1 + dosage 2, étaient tout à fait aberrants.

Il fallait donc étudier l'influence de l'acidité et de la richesse en phosphore sur cette précipitation de manière à pouvoir appliquer ce procédé au dosage du phosphore lipoïdique.

I. INFLUENCE DE L'ACIDITE

Nous avons effectué plusieurs séries de dosage sur une solution d'acide phosphorique type.

Première série: Influence de l'acide sulfurique seul.

Dans un petit matras de kjeldahl, on met:

0,31 mgr. de phosphore (1 cm³ d'une solution N 50 d'acide phosphorique);

x cm³ d'acide sulfurique;

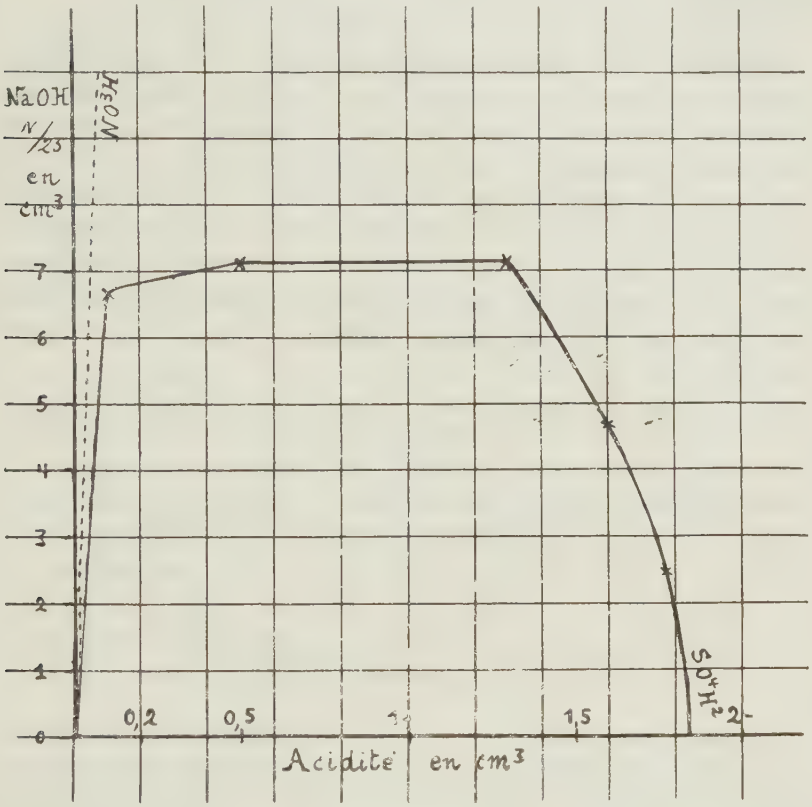
6 cm³ d'eau;

2 cm³ d'une solution saturée de nitrate d'ammonium;
on ajoute:

6 cm³ d'une solution de molybdate d'ammonium à 5 % et on laisse au bain-marie bouillant pendant 15 minutes.

Si x—0, c'est-à-dire en l'absence d'acide, il n'y a pas précipitation; mais déjà pour une acidité très faible, le précipité se forme et le dosage est possible. Avec une acidité croissante les résultats restent un temps à peu près stationnaires, aux erreurs expérimentales près; puis brusquement quand l'acidité dépasse 2,2 gr. (1,3 cm³ de l'acide employé), les résultats deviennent déficitaires, pour tomber à 0 avec une acidité voisine de 3,3 gr.

(2 cm³). Un bon dosage exige donc, dans ces conditions, une acidité comprise entre 0,1 et 1,3 cm³ après minéralisation.



Influence des acides sulfurique et nitrique sur le dosage du phosphore d'après la méthode de Macheboeuf (la teneur en P de la prise d'essai demeurant la même). Les résultats de ce dosage sont exprimés en NaOH N/25.

Deuxième série: Influence de l'acide nitrique seul.

Si l'on remplace, dans la série précédente, l'acide sulfurique par de l'acide nitrique, le dosage n'est plus possible car cet acide détermine un précipité blanc de tétramolybdate d'ammonium et d'acide molybdique qui vient se surajouter au précipité de phosphomolybdate d'ammonium.

Troisième série: Influence simultanée des acides sulfurique et nitrique.

Pour étudier cette influence nous avons fait deux essais parallèles:

1° En prenant toujours 0,5 cm³ d'acide sulfurique nous avons ajouté des quantités d'acide nitrique variant de 0,2 à 1 cm³: dans ces conditions, le dosage donne de bons résultats.

2° Nous avons alors interverti les facteurs en prenant constamment 0,5 cm³ d'acide nitrique et en faisant varier la concentration en acide sulfurique. Cette série nous donna d'abord des résultats troublants: Un même dosage répété deux ou trois fois aboutissait à des chiffres sensiblement différents. Nous en avons trouvé la cause dans le fait que nous abandonnions souvent le précipité au contact des eaux-mères, comme l'indique du reste Mme Soerensen. Voici, par exemple, quelques résultats pour une acidité de 0,3 cm³ d'acide sulfurique et 0,5 cm³ d'acide nitrique:

7,15 cm³ NaOH N/25, le précipité étant séparé par filtration de la solution tiède.

7,40 cm³ NaOH N/25, le précipité étant resté au contact des eaux-mères pendant 6 heures.

8,30 cm³ NaOH N/25, le précipité étant resté au contact des eaux-mères pendant 24 heures.

13 cm³ NaOH N/25, le précipité étant resté au contact des eaux-mères pendant 3 jours.

Mais même en filtrant le précipité de suite, on obtient des résultats erronés si la concentration en acide sulfurique est trop faible par rapport à l'acide nitrique: on se rapproche alors du tracé relatif à l'acide nitrique seul. Ainsi avec 0,2 cm³ d'acide sulfurique et 0,5 cm³ d'acide nitrique, toutes conditions égales d'ailleurs, il nous a fallu 9,30 cm³ de soude N/25 au lieu de 7,15 cm³, ce qui est une erreur appréciable. Un tel cas peut se présenter si l'acide sulfurique est en quantité à peine suffisante pour la minéralisation; l'excès d'acide nitrique est alors difficilement éliminé.

Il résulte de ces trois séries d'essais que, pour un volume total de 15 cm³, un dosage exact nécessite: une acidité finale en acide sulfurique comprise entre 0,5 cm³ et 1,3 cm³ (c'est-à-dire 0,8 gr. à 2,2 gr.), une acidité faible en acide nitrique ou l'absence complète d'acide nitrique (ce qui permet de faire un dosage exact même avec des quantités d'acide sulfurique inférieures à 0,8 gr.).

II. INFLUENCE DE LA CONCENTRATION DU PHOSPHORE

Nous avons signalé qu'il y a avantage à opérer toujours sur la même quantité de phosphore. Or si l'on connaît souvent approximativement la richesse en phosphore de la substance à analyser, il est pourtant des cas où l'on ignore son ordre de grandeur. Aussi avons-nous essayé de voir quels étaient les écarts donnés par la méthode si l'on fait varier la teneur en phosphore. D'après Chesneau (34), la teneur en phosphore du complexe augmente avec la richesse en phosphore de la solution et comme l'on dose par alcalimétrie le phosphore et le molybdène du complexe, on doit obtenir des résultats pêchant par excès quand la solution est pauvre en phosphore. Kleinmann (76) l'avait du reste déjà constaté et il en conclut que la méthode était à rejeter pour des quantités de phosphore inférieures à 0,4 mgr. Nous avons contrôlé ces essais et nous sommes arrivé à la conclusion que l'écart, tout en étant réel, n'est pas si grand qu'on l'a bien voulu dire, à condition toutefois de ne pas laisser le précipité trop longtemps au contact de ses eaux-mères. Voici les chiffres que nous avons trouvés, en opérant avec un volume total de 15 cm³:

Phosphore	Soude N/25
0,155 mgr.	3,60 cm³
0,310 mgr.	7,15 cm³
0,620 mgr.	14,20 cm³

L'écart est ici inférieur à 2 %, c'est-à-dire voisin de l'erreur expérimentale, pour une variation de phosphore de 1 à 4.

III. APPLICATION AU DOSAGE DU PHOSPHORE LIPOIDIQUE

Dans le cas précis du dosage du phosphore lipoïdique, c'est évidemment, seule, l'acidité finale, après minéralisation, qui entre en ligne de compte. Il s'agit donc de connaître cette acidité dont dépend l'exactitude du dosage. Un moyen très simple consiste à la doser approximativement dans le filtrat obtenu après séparation du précipité de phosphomolybdate. En supposant que tout l'acide nitrique a été volatilisé par une ébullition prolongée, on peut doser l'acide sulfurique restant par de la soude normale en

présence de phénolphtaléine. Ce dosage n'est évidemment qu'approché car le virage est influencé par la présence de sels ammoniacaux (le témoin, constitué par 6 cm³ d'eau, 2 cm³ de nitrate d'ammonium et 6 cm³ de la solution de molybdate, exige 2,5 cm³ de soude N); d'autre part l'élimination de l'acide nitrique peut ne pas être totale. Néanmoins nous avons trouvé, de cette façon, que 100 mgr. de graisse nécessitent en moyenne 0,5 cm³ d'acide sulfurique, ce chiffre étant obtenu en divisant la différence entre l'acidité primitive et l'acidité finale par le nombre de décigr. de graisse minéralisée.

Prises d'essai en mgr.	Acidité en cm³ d'ac. sulfurique		Différence totale	Différence pour 100 mgr.
	initiale	finale		
7	1	0,97	0,03	0,43
16,5	1	0,92	0,08	0,49
100	2	1,47	0,53	0,53
110	0,85	0,31	0,54	0,49
158	1,4	0,63	0,77	0,48
176	3	2,02	0,98	0,55
352	3	1,06	1,94	0,55
684	6	2,91	3,09	0,45
704	6	2,00	4,00	0,56
705	6	2,08	3,92	0,55
735	6	1,85	4,15	0,56
880	7	1,72	5,28	0,60
882	7,5	2,20	5,30	0,60
1113	8	1,25	6,75	0,60
1322	10	2,80	7,20	0,54
1400	9	2,44	6,56	0,47

Pratiquement, cette quantité ne suffirait pas et la minéralisation, pour se faire rapidement et sans soubresauts, exige à peu près 0,65 cm³ d'acide sulfurique pour 100 mgr. de lipides, De plus, il faut un minimum de 0,5 cm³ d'acide sulfurique pour éliminer facilement l'excès d'acide nitrique de manière à permettre un dosage exact. — Ces données n'ont évidemment qu'une valeur pratique, puisque, théoriquement, les acides sul-

furique et nitrique peuvent, en partie, se suppléer réciproquement dans la minéralisation.

Au total, on peut donc calculer la quantité d'acide sulfurique nécessaire pour minéraliser facilement et rapidement une quantité connue de graisse par la formule:

$$x = 0{,}65\ a + 0{,}50, \text{ ou } x = \frac{1{,}3\ a + 1}{2} \quad \text{(formule 1)}$$

x étant le nombre de cm³ d'acide sulfurique,
et a le nombre de décigr. de graisse.

L'acidité finale sera égale à: 0,15 + 0,50 (formule 2).

Avec une acidité finale dépassant 1,3 cm³ ,le dosage ne serait plus possible, si l'on était obligé d'opérer sur un volume total de 15 cm³. Mais l'expérience a montré que l'on peut, sans inconvénients notables, augmenter proportionnellement tous les réactifs nécessaires à la précipitation. C'est ainsi que nous avons titré une même quantité de phosphore (0,31 mgr.) en employant les doses suivantes d'acide, d'eau et de réactifs:

	cm³			
Acidité en cm³ d'acide sulfurique	1	2	3	4
Eau distillée	6	12	18	24
Sol. sat. de nitrate d'ammonium	2,5	5	7,5	10
Sol. de molybdate d'ammonium à 5 % ..	6	12	18	24
Volume total	15	30	45	60
Soude N/25	7,15	7,35	7,45	7,65

L'écart peut donc atteindre 7 % dans les cas extrêmes.

Il est un peu inférieur si l'on opère sur 0,155 mgr. de phosphore; nous avons trouvé:

3,8 cm³ de soude N/25 avec un volume total de 60 cm³
et 3,6 — 15 cm³

La différence est ici égale à 5,2 %.

Connaissant l'acidité finale par la formule 2, on peut donc calculer facilement les quantités de réactifs à ajouter pour avoir un dosage exact. Nous avons complété à:

15 cm³	avec a	< 2
30 „	„	< 5
45 „	„	< 8
60 „	„	> 8

Il s'en suit que la méthode permet de doser avec une approximation suffisante environ 0,1 mgr. de phosphore dans

2 gr. de lipides, ce qui correspond à une teneur de 0,005 gr. %, ou à une concentration limite de 1/20.000.

IV. TECHNIQUE DE LA METHODE

Pour le dosage du phosphore lipoïdique, nous avons donc employé la technique suivante:

Dans un matras de Kjeldahl de capacité convenable, on introduit une quantité de matières grasses telle que leur teneur en phosphore soit autant que possible de l'ordre de 2 à 6 dixièmes de mgr. (On peut les introduire en solution éthérée ou chloroformique et chasser le solvant par distillation.) On y ajoute la quantité d'acide sulfurique donnée par la formule 1, et l'on chauffe d'abord doucement, puis fortement jusqu'à ce que le charbon, boursouflé au début, tombe en de fines particules et se rassemble au fond du matras. Il faut éviter cependant d'atteindre la température de décomposition de l'acide sulfurique (à ce moment, il se produit un abondant dégagement de vapeurs blanches au contact même du liquide), car on risque d'avoir des pertes de phosphore dues au milieu réducteur. Le temps de chauffe en milieu sulfurique varie, selon la quantité de lipides à minéraliser, de 10 minutes à une demi-heure. Au bout de ce temps, on laisse refroidir, puis l'on ajoute de l'acide nitrique par petites portions (0,5 à 1 cm^3 en une fois) en chauffant chaque fois jusqu'à élimination des vapeurs rutilantes. Le liquide s'éclaircit peu à peu pour devenir finalement incolore quand l'acide nitrique est complètement chassé. On y ajoute alors les quantités d'eau et de nitrate d'ammonium prévues d'après le calcul de l'acidité finale suivant la formule 2. On porte au bain-marie bouillant pendant un quart d'heure, puis l'on précipite par la quantité prescrite de molybdate d'ammonium à 5 % tout en continuant à chauffer le mélange pendant un quart d'heure. Le précipité de phosphomolybdate est séparé de suite de ses eaux-mères par filtration sur microfiltre en verre aggloméré (le 13fG.3 du commerce) [1]. Le filtrat sert à

[1] Le microfiltre en verre aggloméré présente certains avantages par rapport au filtre d'amiante: a) Quand on reprend le précipité de phosphomolybdate par l'ammoniaque, on saisit mieux le moment où tout est passé en solution car la disparition de la couleur jaune est plus visible sur une plaque filtrante blanche que sur un filtre d'amiante. b) Le filtre en verre aggloméré se nettoie facilement au mélange sulfochromique chaud.

vérifier l'acidité: on en prélève 5 cm³ qui doivent être neutralisés par moins de 15 cm³ de soude N. Quant au précipité, il est lavé à 5 reprises avec de l'alcool à 50° par décantation et siphonage. On le dissout ensuite dans 2 à 5 cm³ d'ammoniaque diluée au quart; on transvase la solution quantitativement dans une fiole d'Erlenmeyer [2] et on la porte à l'ébullition pendant 20 minutes après y avoir ajouté 25 cm³ de soude N/25. On verse alors dans le liquide alcalin 25 cm³ d'acide sulfurique N/25, et, après une ébullition de 2 à 3 minutes, on dose l'excès d'acide au moyen de soude N/25 en présence de phénolphtaléine. Le nombre de cm³ multiplié par 0,044 donne en mgr. la teneur en phosphore de la prise d'essai.

[2] Le déplacement de l'ammoniaque par la soude est effectué dans une fiole d'Erlenmeyer ordinaire, sans cloche capillaire. L'ébullition est toujours régulière; jamais nous n'avons constaté de soubresauts. On évite ainsi l'imprécision du virage qu'occasionne la cloche capillaire préconisée par M. Macheboeuf.

CHAPITRE IV.

DOSAGE DU PHOSPHORE LIPOIDIQUE DANS LE LAIT

Pour extraire les phosphatides du lait, il faut les libérer de l'édifice complexe dans lequel ils sont engagés.

Comme point de départ, on a envisagé le *lait sec,* le *lait coagulé* et le *lait liquéfié.*

Le *lait sec* est certainement peu avantageux, encore que les procédés modernes de dessiccation industrielle donnent des poudres très ténues dont l'épuisement semble facile. La dessiccation préalable du lait présente deux écueils principaux: 1° La température, le plus souvent élevée, altère les phosphatides, comme l'ont montré Bordas et Raczkowski (27) et diminue leur solubilité dans les solvants usuels. 2° Les phosphatides se trouvent englobés dans les protides durcis et échappent ainsi à un épuisement complet. — Quant à la dessiccation au moyen d'une substance chimique, tel le sulfate de soude anhydre (dessiccation qui d'ailleurs n'en est pas une au sens véritable du mot), elle présente l'inconvénient d'augmenter considérablement le volume à épuiser; l'extraction n'est donc jamais totale.

Le *lait coagulé* semble être le point de départ le plus communément adopté. Plusieurs cas sont à considérer: les phosphatides passent tantôt dans le coagulum, tantôt dans le petit lait, mais le plus souvent ils se répartissent d'une façon plus ou moins variable entre les deux phases. Nous avons essayé la précipitation par les acides acétique et silicotungstique, l'alcool éthylique et l'acétone. Il reste en général du phosphore éthérosoluble dans les filtrats. Ausi faut-il soumettre à l'extraction coagulum et petit lait pour avoir des résultats quantitatifs. Dans la précipitation éthéro-alcoolique, au contraire, tous les phosphatides passent en solution de sorte qu'il est inutile d'épuiser le précipité qui se forme.

D'autre part, on a dosé le phosphore dans les extraits éthéro-alcooliques du lait alcalinisé d'après la méthode d'Adam

(1) ou de Röse-Gottlieb (7).

Nous avons contrôlé un certain nombre de ces procédés et nous en avons essayé d'autres pour nous rendre compte des causes qui peuvent expliquer les chiffres contradictoires relevés dans la littérature. Tous nos essais ont porté sur un lait de grand mélange, celui de la Laiterie Centrale de Strasbourg.

I. PRECIPITATION ET EXTRACTION ALCOOLIQUES

L'alcool chaud passe pour le solvant de choix des phosphatides. Aussi avons-nous essayé en premier lieu de doser le phosphore éthéro-soluble dans l'extrait alcoolique du lait. — 20 cm^3 de lait sont versés dans 80 cm^3 d'alcool à 95°, on filtre: le filtrat est évaporé à sec, sous pression réduite, sans dépasser 50°; le résidu, épuisé à l'éther, donne 2,55 mgr. de phosphatides. Le coagulum est traité par l'alcool bouillant dans l'appareil de Kumagawa pendant 5 heures; l'extrait alcoolique, évaporé à sec comme précédemment, est repris par de l'éther anhydre qui dissout 3,71 mgr. de phosphatides. Au total, cela fait 313 mgr. pour un litre de lait. — Sur le même lait, nous avons effectué une autre extraction en réunissant cette fois le filtrat alcoolique et l'extrait alcoolique du coagulum. L'épuisement éthéré consécutif nous donna 6,14 mgr., c'est-à-dire 307 mgr. au litre. — Nous avons également essayé d'appliquer ce procédé à des quantités plus importantes de lait: 600 cm^3 de lait, traités comme il a été indiqué par 2.400 cm^3 d'alcool à 95°, donnent, après 12 heures d'extraction dans l'appareil de Kumagawa et 4 heures d'extraction éthérée au Soxhlet, 21,3 gr. de lipides dont 204 mgr. de phosphatides, ce qui fait 340 mgr. au litre.

La moyenne de ces extractions est donc égale à 320 mgr. par litre de lait.

II. PRECIPITATION ET EXTRACTION ETHERO-ALCOOLIQUES

L'extraction alcoolique ayant donné des résultats inférieurs à ceux signalés dans la littérature, nous nous sommes adressé à la méthode d'extraction de Bloor (19) qui, d'après Hess et Helman (67), donnerait jusqu'à 1,7 gr. de phosphatides par litre de lait. Nous avons opéré de la façon suivante: 10 cm^3

de lait sont versés goutte à goutte dans un flacon de 200 cm³ contenant 80 cm³ d'un mélange alcool-éther (3+1). On chauffe au bain-marie électrique pendant 2 minutes en agitant sans cesse; après refroidissement on complète à 200 cm³ avec le mélange éthéro-alcoolique et l'on filtre. L'extrait éthéro-alcoolique renferme 0,62 mgr. de phosphore ce qui correspondrait à 16,35 mgr. de phosphatides. Mais dans des essais identiques nous avons recherché le phosphore dans l'extrait éthéro-alcoolique avant minéralisation et la réaction fut toujours très nettement positive. Il est donc démontré que l'extrait alcoolique renferme du phosphore minéral et peut-être même du phosphore protéique, quoique la réaction de Millon fût négative.

Hess et Helman donnent à l'appui de leur méthode les arguments suivants:

1° La lécithine surajoutée au lait se retrouve quantitativement dans l'extrait éthéro-alcoolique.

2° Le phosphate de potasse additionné au lait ne passe pas dans l'extrait.

3° L'extrait éthéro-alcoolique ne cède pas de phosphore à l'eau.

Le premier argument repose évidemment sur une donnée expérimentale indiscutable. mais les deux autres sont loin d'avoir la valeur que les auteurs voudraient leur donner. En effet, le lait renferme naturellement environ 3 grammes de phosphates au litre de sorte que l'addition d'une petite quantité de phosphates [1] ne change absolument rien à leur solubilité dans l'alcool-éther. D'autre part, si, d'après les auteurs américains, l'extrait éthéro-alcoolique ne cède pas de phosphore à l'eau, ce qui est en contradiction avec nos expériences, cela peut être dû à la difficulté d'épuiser à l'eau un mélange riche en graisse.

Pour éliminer le phosphore minéral ou protéique entraîné dans l'extrait éthéro-alcoolique, nous avons évaporé à sec cet extrait en nous aidant du vide, pour le reprendre ensuite par de l'éther rigoureusement anhydre. Le phosphore, dosé dans l'extrait éthéré ainsi obtenu, correspond à 3,24 mgr. de phosphatides pour 10 cm³ de lait, c'est-à-dire 324 mgr. au litre, ce qui représente sensiblement le chiffre obtenu dans l'extraction

[1] 5 cm³ d'une solution de phosphate monopotassique (renfermant ½ mgr. de phosphore) ajoutés à 45 cm³ de lait.

alcoolique. La méthode de Bloor fournit donc des résultats à peu près identiques à ceux donnés par les autres méthodes d'extraction; sa supériorité n'est qu'apparente.

III. PRECIPITATION ACETONIQUE ET EXTRACTION ALCOOLIQUE

D'après Ch. Porcher et L. Comby (117), l'acétone est un excellent agent précipitant dans l'analyse biologique du lait. Nous avons pensé qu'une précipitation acétonique allait nous donner un coagulum à partir duquel l'extraction des phosphatides serait facile et complète. Voici le modus operandi: 40 cm³ de lait sont versés dans 160 cm³ d'acétone; le coagulum filtré est lavé à l'acétone, puis épuisé à l'alcool. L'extrait alcoolique repris par l'éther donne 2,08 mgr. de phosphatides, c'est-à-dire 52 mgr. au litre. Le filtrat acetonique est alors évaporé à sec et à pression réduite. Le résidu, repris par l'éther anhydre, renferme, contre toute attente, la majorité des phosphatides: 8,87 mgr., ce qui fait 222 mgr. pour 1 litre. Au total, on extrait de cette façon 274 mgr. de phosphatides. La solubilité des phosphatides dans l'acétone peut s'expliquer par la présence d'une très grande quantité de graisses neutres.

IV. PRECIPITATION ACETIQUE ET EXTRACTION ETHEREE OU ALCOOLIQUE

Pour des raisons que nous allons exposer dans le prochain chapitre, nous avons également essayé la précipitation acétique du lait comme on la pratique au Laboratoire municipal de Paris pour le dosage du beurre dans le lait. Dans ce but, 50 cm³ de lait sont précipités par 450 cm³ d'une solution d'acide acétique à 2 p. 1000; on filtre sur entonnoir de Büchner et l'on dessèche le coagulum dans le vide sulfurique pendant une nuit. On l'épuise alors à l'éther dans l'appareil de Soxhlet. Le beurre obtenu (environ 1,6 gr.) est minéralisé en vue d'un dosage de phosphore. L'éther ne dissout qu'une faible partie des phosphatides: 1,9 mgr. (38 mgr. au litre). Le coagulum insoluble dans l'éther est alors épuisé à 2 reprises (2 fois 2 heures) par de l'alcool dans l'appareil de Kumagawa et l'extrait alcoolique ainsi obtenu, une fois desséché, est repris par de l'éther, dans lequel

57 mgr. se dissolvent dont 11,3 mgr. de phosphatides, ce qui fait 226 mgr. au litre. Le filtrat acétique, porté à l'ébullition pendant 2 à 3 minutes, abandonne un précipité d'albumines coagulables qui, traité par de l'alcool, donne un extrait renfermant 0,76 mgr. de phosphatides (15,3 mgr. p. 1000). On obtient donc en tout: 38 + 226 + 15 = 279 mgr. de phosphatides au litre. Un autre essai identique donna respectivement 35,4 + 208 + 16,2 = 259,6 mgr.

Nous avons également recherché le phosphore lipoïdique dans le filtrat acétique après élimination de la caséine et des protéines coagulables. Pour ce faire, le liquide acétique, neutralisé avec de la soude, est évaporé à sec en s'aidant du vide et en présence d'un peu d'alcool octylique, destiné à faire tomber la mousse. Le résidu est épuisé au chloroforme, à trois reprises; l'extrait chloroformique (250 mgr. pour 1 litre) ne renferme que des traces infimes de phosphore.

V. PRECIPITATION PAR L'ACIDE SILICOTUNGSTIQUE ET EXTRACTON ALCOOLIQUE

Il ressort des recherches de Pichon-Vandeuil (113) que l'acide silicotungstique est un des meilleurs désalbuminant du lait. Or, comme les phosphatides sont précisément liés aux protides, nous avons pensé que le coagulum obtenu par une solution à 5 % d'acide silicotungstique renfermerait la totalité du phosphore lipoïdique et le céderait facilement à l'alcool. Des essais effectués dans ce sens n'ont pas donné les résultats qu'on en attendait; du reste la filtration et la dessiccation du coagulum sont des plus pénibles.

VI. EXTRACTIONS ETHERO-ALCOOLIQUES EN MILIEU ALCALIN

(Méthodes d'Adam et de Röse-Gottlieb).

Quelques auteurs, notamment Chapman (33), Pien et Maurice (98) ont eu l'idée de doser le phosphore extrait par la méthode d'Adam ou de Röse-Gottlieb. Leurs résultats contradictoires diffèrent également de ceux que nous avons précédemment obtenus: cela nous a incité à reprendre la question. Quelques essais préliminaires nous ont donné des résultats fort dis-

cordants. Ainsi, pour un même lait, nous avons trouvé successivement 480 mgr. et 330 mgr. de phosphatides au litre par la méthode de Röse-Gottlieb, 507 et 412 mgr. par la méthode d'Adam. Nous avons alors remarqué que l'éther entraîne des traces de la solution hydroalcoolique, ce qui amène des erreurs par excès. En effet, quand on mélange 20 cm^3 de lait et 44 cm^3 de réactif d'Adam, on obtient 35 cm^3 d'une solution hydroalcoolique qui renferme la quasi totalité du phosphore du lait, c'est-à-dire environ 18 mgr. pour 35 cm^3, soit 0,5 mgr. au cm^3. Un cm^3 entraîné peut donc simuler la présence de 10 mgr. de phosphatides. Il est donc absolument indispensable de laver et la solution éthérée et l'ampoule dans laquelle on opère. Des lavages à l'eau distillée nous ont donné des mécomptes par suite de la formation presque inévitable d'émulsions qui, tout en étant peu accentuées, entraînent une partie des phosphatides (un tiers, par exemple, dans la méthode d'Adam). Pour éviter ces émulsions, des lavages avec une solution de chlorure de sodium à 1 % nous ont donné des résultats satisfaisants.

Voici le mode opératoire adopté:

20 cm^3 de lait sont agités avec 44 cm^3 de réactif d'Adam dans une ampoule à décantation ordinaire. Quand la couche éthérée s'est bien séparée, on soutire la couche hydroalcoolique jusqu'à 1/2 cm. du robinet. On laisse au liquide adhérent à la paroi le temps de se rassembler au fond et l'on soutire cette fois jusqu'au niveau du robinet. On introduit alors, au moyen d'une pipette, 50 cm^3 d'une solution de chlorure de sodium à 1 % que l'on fait couler le long des parois et l'on retourne l'ampoule de manière à la laver complètement à son intérieur. On soutire les eaux de lavage en deux fois comme précédemment, et l'on dose le phosphore dans la solution éthérée. — Pour la méthode de Röse-Gottlieb, nous avons effectué des lavages semblables.

Les résultats obtenus sont exprimés en mgr. de phosphatides pour un litre de lait.

Méthode d'Adam	Méthode de Röse-Gottlieb
315	281
316	297
287	305
Moyenne 306	Moyenne 294

La méthode d'Adam semble donner des résultats légèrement supérieurs, mais la cause de cette différence demeure inexplicable.

Il nous restait à rechercher si, dans la méthode d'Adam, du phosphore éthéro-soluble passe dans la phase hydroalcoolique. Pour ce faire, le liquide hydroalcoolique est évaporé à sec dans le vide, l'ammoniac distille et le milieu devient neutre. Le résidu, épuisé au chloroforme, donne un extrait très faible (50 mgr. pour 1 litre de lait) qui est dépourvu de phosphore.

VII. CONCLUSION

Si l'on compare maintenant les différents procédés d'extraction du phosphore lipoïdique, on peut grouper les résultats obtenus de manière à en faire une moyenne générale:

	Phosphatides (en mgr.) pour 1 litre de lait
Précipitation et extraction alcooliques	320
Précipitation éthéro- alcoolique	324
Précipitation acétonique	274
Précipitation acétique et extraction alcoolique	269
Méthode d'Adam	306
— de Röse-Gottlieb	294

Moyenne: 293,7

Ces chiffres nous autorisent à admettre, pour le lait de vache, une teneur moyenne de 300 mgr. de phosphatides par litre. Dans ces conditions les recherches antérieures relatives au phosphore lipoïdique du lait sont sujettes à révision, les conclusions étant douteuses par suite de l'inexactitude des méthodes d'extraction. Seuls les résultats de Brodrick-Pittard pourraient se rapprocher de la vérité. Pour étudier les variations du phosphore lipoïdique sous des influences diverses — si variations il y en a — il semble que les méthodes d'Adam ou de Röse-Gottlieb seraient susceptibles de donner rapidement des résultats satisfaisants, à condition d'effectuer deux ou plusieurs essais parallèles et de prendre la moyenne de leurs résultats.

CHAPITRE V.

PURIFICATION DES PHOSPHATIDES

Dans le précédent chapitre, nous avons étudié quelques méthodes d'extraction des phosphatides ou plus exactement des procédés de détermination du phosphore lipoïdique dans le lait, car l'extraction, tout en étant quantitative, touche également d'autres substances. L'extrait obtenu renferme souvent à peine 1 % de phosphatides. Une étude qualitative exige donc une purification énergique de ces extraits.

I. PRECIPITATION ALCOOLIQUE DU LAIT

Le cas qui se présente le plus généralement est celui d'un extrait alcoolique renfermant, à côté des sucres, sels, etc., 35 gr. de beurre et environ 300 mgr. de phosphatides par litre de lait.

Comment purifier cet extrait?

A priori, il existe deux possibilités:

1° Utiliser la différence de solubilité des graisses neutres et des phosphatides dans l'alcool — ces derniers étant plus solubles — pour faire une extraction fractionnée: c'est le principe du procédé utilisé par Bischoff (16).

2° Utiliser l'insolubilité relative des phosphatides dans l'acétone et opérer par précipitation fractionnée.

La première méthode est fort compliquée: elle nécessite des quantités importantes d'alcool, des concentrations pénibles et la multitude des extractions fractionnées favorisent l'oxydation. Elle est du reste incapable de débarrasser complètement les phosphatides des graisses, de sorte qu'on est obligé de recourir de toute façon à l'acétone. Nous nous sommes donc adressé de suite à la précipitation fractionnée par l'acétone qui est couramment employée pour la purification des phosphatides.

32,2 gr. de beurre renfermant 326 mgr. de phosphatides sont précipités par 150 cm^3 d'acétone pur. La fraction insoluble (597 mgr.) ne contient que 23 % de phosphatides (142 mgr.) qui représentent seulement 43 % du phosphore lipoïdique total.

Le procédé n'est donc guère utilisable à cause des fortes pertes. Or, l'on sait à la suite des recherches de Nerking (103) que l'adjonction d'une petite quantité de chlorure de magnésium favorise la précipitation et la rend presque complète. Nous avons essayé cette variante du procédé et, malgré de nombreuses tentatives, nous n'avons jamais pu obtenir qu'une centaine de mgr. de phosphatides au litre, souillés de 150 à 250 mgr. d'autres substances. Parmi ces corps qui présentent les mêmes caractères de solubilité que les phosphatides, il convient de citer avant tout la myristodipalmitine et la myristodistéarine, glycérides mixtes insolubles dans l'acétone, signalés par de Collo et Scopinaro (38).

II. PRECIPITATION ACETONIQUE DU LAIT

Comme ce sont surtout les lipides qui gênent dans la purification des phosphatides, nous avons cherché à dégraisser au préalable le lait sans enlever naturellement les phosphatides, qui seraient obtenus par une extraction alcoolique ultérieure. Nous avons pensé que l'acétone pourrait dissoudre le beurre sans toucher aux phosphatides. Mais les essais rapportés dans le précédent chapitre montrent que les quatre cinquièmes du phosphore lipoïdique passent dans l'acétone à la faveur des graisses neutres.

III. PRECIPITATION ACETIQUE DU LAIT

Après diverses tentatives, nous avons trouvé un procédé qui donne de meilleurs résultats et dont voici le principe:

Le lait est versé dans une solution diluée d'acide acétique. La caséine précipite en entraînant les lipides, on filtre. Le filtrat est porté à l'ébullition pendant 2 à 3 minutes et le coagulum, filtré à son tour, est réuni au précipité de caséine. Les deux coagulums sont alors épuisés à l'éther qui dissout la majorité des graisses et très peu de phosphatides. Une extraction alcoolique ultérieure enlève le reste des lipides — ce qui vient confirmer la supériorité de l'alcool comme solvant des matières grasses — et la quasi totalité des phosphatides. — Nous allons exposer rapidement nos différents essais sur les coagulums ainsi obtenus.

A. — Premier essai: Précipitation fractionnée par l'acétone

Un litre de lait est précipité par 9 litres d'une solution d'acide acétique à 2 p. 1000. On filtre sur toile avec expression et l'on précipite dans le filtrat, par ébullition, la lactalbumine et la lactoglobuline. Sur les 2 coagulums, on effectue successivement une extraction éthérée, puis une extraction alcoolique dans l'appareil de KUMAGAWA.

	1° Extraction éthérée		2° Extraction alcoolique	
	Extr. total	Phosphatides	Extrait total	Phosphatides
Caséine	11 gr. (1)	41,3 mgr.	2,08 gr.	199,4 mgr.
Protéines coagulables	3 „	3,2 „		14,8 „

Les extraits alcooliques réunis sont épuisés au chloroforme, puis soumis à des précipitations fractionnées par l'acétone additionné de quelques gouttes d'une solution saturée de chlorure de magnésium. Les résultats du fractionnement sont schématisés dans le tableau suivant:

(Il a été fait abstraction des quantités utilisées pour les dosages.)

Extrait chloroformique: 2,08 gr.
(Phosphatides 214 mgr. soit 10.3%)
précipité par acétone + Mg Cl^2

Précipité: 356 mgr. (Phosphatides 154,5 mgr.) reppté par acétone + Mg Cl^2		Solution concentrée et repptée par acétone + Mg Cl^2	
Précipité: 207 mgr. reppté par acétone + Mg Cl^2	Solution évaporée 145 mgr.	Précipité: 124 mgr. (Phosphat. 4,8 mgr.)	Solution évaporée
Précipité: 199 mgr. (Phosphatides 124,3 mgr.) soit 62.5%	Solution évaporée 8 mgr.		(Lipides 1.5 gr. Phosphatides 5,5 mgr.)

B. — Deuxième essai: Extraction chloroformique

Le mode opératoire est semblable à quelques variantes près:

1° Les coagulums ne sont pas exprimés, mais réunis et desséchés dans le vide sulfurique pendant trois jours à la température ordinaire.

2° Une extraction chloroformique a été effectuée sur le résidu de l'épuisement éthéré et alcoolique dans le but de voir

(1) Perte de « beurre » par suite de l'expression du coagulum.

si le chloroforme dissolvait de la sphingomyéline insoluble dans l'éther et peu soluble dans l'alcool.

Extractions successives	Extrait total	Phosphatides	Pourcentage
Extraction éthérée	35,5 gr.	27 mgr.	0,07%
Extraction alcoolique	1,431 „	217 „	15,1 %
Extraction chloroformique . . .	0,056 „	4,8 „	8.7 %

La quantité de phosphore lipoïdique qui passe dans le chloroforme à la suite de l'alcool est donc insignifiante.

Troisième essai: Recherche d'une méthode de purification plus complète

Nous avons suivi le même mode opératoire.

Extrait éthéré: 33 gr., dont 51,3 mgr. de phosphatides.
Extrait alcoolique: 1,11 gr., précité par acétone + Mg Cl^2.

Précipité: 302 mgr. reprécipité par acétone + Mg. Cl^2 — Solution évaporée: 630 mgr.

Précipité 185 mgr. (Phosphatides 157 mgr.) soit 84% — Solution évaporée: 167 mgr.

Les phosphatides obtenus sont encore impurs; nous avons essayé de les purifier davantage, sans succès du reste, à cause de la petite quantité de produit dont nous disposions. Il fallait donc opérer sur des quantités plus grandes.

Quatrième essai: Extraction et purification des phosphatides de cinq litres de lait

5 litres de lait sont versés en filet mince dans 5 litres d'eau additionnée de 50 cm^3 d'acide acétique. — Nous avons réduit la quantité de réactif précipitant pour des raisons d'ordre pratique, et augmenté en conséquence la concentration en acide acétique. — Pour dessécher le coagulum de caséine et de protéines, obtenu comme précédemment, nous l'avons d'abord placé dans le vide sulfurique; mais ce procédé s'est montré inefficace pour la grande quantité de coagulum, ou alors il aurait fallu prolonger le séjour dans le vide pendant plus de 8 jours tout en renouvelant l'acide sulfurique tous les jours. Nous avons atteint plus rapidement le résultat recherché en effectuant la dessiccation à l'étuve à 30° dans laquelle nous avons

placé un ventilateur tournant au ralenti grâce à une résistance intercalée en série. On retourne de temps en temps la masse au moyen d'une spatule afin de renouveler les surfaces. La dessiccation est complète en 24 heures. Pour les extractions nous avons pris un entonnoir de grande taille (20 cm. de diamètre) fermé par un caoutchouc muni d'une pince. On dispose le précipité sur une toile forte, placée dans l'entonnoir et on y verse un litre et demi d'éther en trois fois de manière à imprégner complètement le coagulum. On remue avec un agitateur et l'on soutire l'éther après un moment de contact. Le résidu, débarrassé de l'éther, est épuisé à l'alcool bouillant de la même manière.

L'extraction éthérée donne 145 gr. de graisses neutres et 190 mgr. de phosphatides. Quant à l'extrait alcoolique, il est précipité à deux reprises par de l'acétone additionné de chlorure de magnésium. Le dernier précipité traité par de l'éther donne une fraction soluble: 957 mgr. (dont 667 mgr. de phosphatides;[1] N/P = 1,26) et une fraction insoluble: 180 mgr. (dont 100 mgr. de phosphatides; N/P = 1,43). Cette dernière fraction, plus riche en azote, renferme vraisemblablement de la sphingomyéline. Des essais de cristallisation à partir de l'alcool chaud ont bien donné des aiguilles d'environ trente μ, nettement visibles au microscope, mais la quantité était trop faible pour permettre une détermination de point de fusion.

Sur la fraction éthéro-soluble nous avons effectué les dosages et déterminations suivants:

Phosphore	2,68 %
Azote	1,52 %
Rapport N/P	1,26
Cendres	11 %
Substances réductrices:	traces
Indice d'iode	37,5
Indice d'iode rapporté aux phosphatides	53,9
Indice d'iode des acides gras des phosphatides	65,1

[1] L'azote a été dosé par Micro-Kjehldahl, selon la technique aujourd'hui classique de Pregl (119), modifiée par Parnas et Wagner (110).

Pour purifier les phosphatides, nous avons utilisé le procédé indiqué par Sano (134) en 1922. La solution chloroformique des phosphatides est agitée deux fois avec une solution aqueuse de chlorure de sodium à 1 %. En partant de 444 mgr., on récupère 375 mgr. renfermant 275 mgr. de phosphatides, c'est-à-dire 73 %. Les impuretés solubles dans l'eau n'atteignent donc que 4 %. La purification de la fraction insoluble dans l'éther porta le taux des phosphatides de 55 % à 74 %. Nous n'avons pas réussi à purifier davantage les phosphatides quoique, dans un essai précédent, nous avions obtenu par le même procédé un produit renfermant 84 % de phosphatides. Les impuretés ne sont ni de nature minérale puisque les cendres ne sont guère supérieures à la normale, ni de nature glucidique puisque le produit est à peine réducteur, ni de nature lipidique puisque rien ne se dissout plus dans l'acétone. Il ne peut donc s'agir que d'impuretés azotées, insolubles dans l'eau ou de produits de décomposition des phosphatides exempts de phosphore.

IV. CARACTERES DES PHOSPHATIDES DU LAIT

A. Hydrolyse

Pour l'hydrolyse des phosphatides du lait, nous avons mis à profit les résultats obtenus avec de la lécithine commerciale et que nous avons exposés dans le Chapitre II.

Nous avons effectué deux essais sur la fraction éthéro-soluble: l'un avec de la potasse alcoolique 2N à l'ébullition pendant deux heures; l'autre avec de la potasse alcoolique N/10 à froid et dans le vide pendant 24 heures. Les résultats sont concordants:

Prise d'essai			Agent de Saponification	Acides gras	%
Produit éthéro-soluble	correspondant à	Phosphatides			
376		253	KOH N/10	198	78.2
336		230	KOH 2N	180	

L'erreur par excès est patente puisque les phosphatides peuvent donner théoriquement au plus 75 % d'acides gras.

A quoi est due cette erreur?

Les acides gras ainsi obtenus donnent un précipité avec l'acétone et le chlorure de magnésium; ils renferment du phosphore (0,9 à 0,93 %) et de l'azote (0,6 %). Si l'on admet que tout le phosphore contenu dans les acides gras est à l'état de phosphatides non hydrolysés, on trouve qu'il y en a 46 mgr. dans le premier essai et 43 mgr. dans le second. Dans ces conditions, 46/253 = 18 % des phosphatides ont échappé à la saponification. On en déduit que 253-46 = 207 mgr. de phosphatides ont donné 198-46 = 152 mgr. d'acides gras, ce qui correspond à un rendement calculé de 73,4 %, chiffre très voisin du pourcentage théorique.

A propos de ces résultats, il convient de faire les remarques suivantes:

1° La liqueur potassique est fortement acidifiée, après l'hydrolyse, par de l'acide chlorhydrique concentré de manière à atteindre approximativement le point isoélectrique de la lécithine (P H 2,7), car, à cette concentration, elle passe plus facilement dans l'éther de pétrole avec les acides gras.

2° La solution pétrolique des acides gras, parfaitement limpide, se trouble par concentration, surtout au moment de la reprise par l'éther de pétrole léger: ce sont sans doute les phosphatides non hydrolysés et plus ou moins oxydés qui précipitent ainsi. Dans les expériences précédentes, le précipité était tellement fin qu'il traversait le filtre à sable. S'il avait été retenu, nous aurions eu 152 mgr. d'acides gras, c'est-à-dire 60 % des phosphatides en essai: or, c'est là précisément le pourcentage que l'on obtient d'habitude dans l'hydrolyse des phosphatides et la coïncidence est vraiment trop frappante pour être due au simple hasard.

B. Indice d'iode

Des déterminations d'indice d'iode ont été effectuées d'une part sur la fraction éthéro-soluble, d'autre part sur les acides gras des phosphatides. Dans ce dernier cas, nous avons précipité par l'acétone et le chlorure de magnésium les phosphatides non hydrolysés qui ont été entraînés dans les acides gras. — Pour la fraction éthéro-soluble, nous avons trouvé un indice d'iode de 37,5. Si l'on admet que seuls les phosphatides ont fixé de l'iode — hypothèse qui n'est pas vérifiée —, on leur trouve

dans ces conditions un indice d'iode de 53,9 et aux 70 % d'acides gras qui en dérivent un indice égal à $\frac{55.9 \cdot 10}{7} = 77$. En réalité, les déterminations d'indice d'iode effectuées sur deux échantillons d'acides gras purifiés ont donné respectivement 65,1 et 68,3, mais l'écart entre les indices calculés et trouvés est faible, ne dépassant pas 10 unités.

V. CONCLUSION

Pour étudier qualitativement les phosphatides du lait, la précipitation acétique suivie d'une extraction éthérée puis alcoolique semble donner des résultats intéressants. Mais les pertes inévitables dues à la série des manipulations successives, l'oxydation probable pendant l'extraction et l'hydrolyse, les impuretés dont il est difficile de débarrasser le produit ultime, sont autant de causes d'erreurs qu'il s'agit d'éliminer au mieux. Dans ces conditions, si l'on veut déterminer l'indice d'iode des acides gras des phosphatides du lait et en suivre les variations possibles, il faut nécessairement effectuer deux déterminations parallèles sur chaque échantillon et prendre la moyenne des résultats trouvés. — Nous proposons le mode opératoire suivant :

Un litre et demi de lait [1] est versé dans un litre et demi d'eau additionnée de 15 cm^3 d'acide acétique. On filtre sur toile sans exprimer et l'on porte le filtrat à l'ébullition pendant 2 à 3 minutes. Le coagulum des protides réunis est lavé à l'eau légèrement acidulée par de l'acide acétique. On laisse égoutter quelques heures, puis on dessèche le coagulum dans le vide sulfurique pendant 3 jours en changeant au moins une fois l'acide sulfurique. Le précipité ainsi desséché est épuisé à l'éther dans l'appareil de Kumagawa [2] pendant 4 à 6 heures.

Débarrassé de l'éther dans le vide, le coagulum est alors traité par de l'alcool dans le même appareil pendant 6 à 8 heures. Pour les deux extractions (alcoolique et éthérée), il est indis-

---

[1] Un litre et demi est la quantité nécessaire pour obtenir par le procédé indiqué environ 100 mgr. d'acides gras provenant des phosphatides.

[2] L'appareil de Kumagawa a été employé à la place du Soxhlet pour réduire le nombre des appareils d'extraction.

pensable de vider les cartouches et de triturer au mortier la poudre à épuiser, sinon il se forme des voies de solvant et l'épuisement se fait mal. L'extrait alcoolique concentré à pression réduite est repris par du chloroforme ; on filtre à travers un papier très poreux puisque la solution est en général colloïdale. On fait deux précipitations par l'acétone et le chlorure de magnésium de la façon habituelle. Le dernier précipité obtenu est hydrolysé avec 150 cm^3 de potasse alcoolique N/10 à froid et dans le vide. On distille l'alcool à pression réduite; on acidifie fortement par de l'acide chlorhydrique concentré (5 cm^3). Trois épuisements à l'éther de pétrole, d'après la technique de Lemeland, donnent les acides gras et les phosphatides non hydrolysés. On précipite ces derniers par l'acétone et le chlorure de magnésium; on filtre. Le filtrat évaporé sert à déterminer l'indice d'iode des acides gras des phosphatides par la méthode de Wijs.

RESUME
ET
CONCLUSIONS GENERALES.

Le lait a été étudié scientifiquement dès le début du dix-neuvième siècle, où la Chimie organique prit son magnifique essor. A son histoire sont liés les noms de pharmaciens célèbres tels que Scheele, Chevallier, Quevenne, Marchand, Adam et de chimistes illustres comme Berzélius, Chevreul et Liebig. Mais malgré plus d'un siècle de recherches ininterrompues, le lait n'a pas livré tous ses secrets. L'étude chimique, qui pourtant est la plus avancée, présente encore bien des lacunes et nos connaissances sur l'origine des substances composant la sécrétion lactée restent toujours incertaines. Aussi se demande-t-on avec le poète, en songeant aux femelles laitières qui de par le monde nous offrent si généreusement le liquide nourricier dont nous devinons à peine l'harmonieuse complexité, comment

« s'accomplit dans la nuit de leurs flancs
« le mystère sacré qui, de ces vertes plantes,
« distillera pour nous les flots tièdes et blancs... »

Parmi tant de problèmes que soulève la sécrétion lactée, celui de la lipogenèse a retenu notre attention. Si l'on s'accorde actuellement à reconnaître aux lipides du lait une triple origine — à savoir: graisse et hydrates de carbone ingérés, graisse de dépôt — on est loin cependant de savoir comment s'opère la transformation de ces lipides en beurre. La question est à l'ordre du jour depuis les travaux de Meigs, Blatherwick et Cary (17) qui considèrent les phosphatides du sang comme les précurseurs des matières grasses du lait. Déjà Porcher et Maynard (118) ont tenté une sorte de confrontation entre les lipides du sang et ceux du lait. Mais de leurs études semble se dégager la nécessité d'une connaissance plus approfondie des substances analysées et de leurs procédés de dosage. — C'est ce que nous avons essayé de réaliser, du moins partiellement.

Notre travail comporte deux parties:

1° une étude critique du dosage des graisses neutres du lait;

2° une étude quantitative et qualitative des phosphatides du lait.

I. — Après quelques mots d'historique, rappelant l'évolution de nos connaissances sur le « beurre », nous avons exposé les principales méthodes de dosage des lipides du lait. Nous avons rassemblé également les différentes techniques utilisées, puisque l'on ne trouve aucune étude d'ensemble sur cette question dans les traités classiques. De plus, cet exposé nous a permis de discuter plus facilement la valeur des méthodes qui peuvent se grouper en deux catégories:

1° les méthodes volumétriques, optiques, densimétriques, etc., toutes relatives; — nous avons relevé leurs principales causes d'erreur.

2° les méthodes pondérales qui, dit-on, donnent des résultats d'une valeur absolue. Pour faire l'examen critique de ces dernières, nous avons étudié plus en détail la méthode officielle, en tant que procédé de référence.

Nous avons comparé ses résultats à ceux de la méthode de Kumagawa qui est, à l'heure actuelle, la meilleure méthode de détermination des lipides dans les tissus animaux et végétaux.

Voici résumées brièvement les conclusions de cette étude:

1° La méthode officielle, — indépendamment de quelques imprécisions dans sa technique, — donne un extrait total qui n'est pas constitué par des glycérides purs: c'est donc une méthode par compensation comme toutes les autres.

2° Le principe de la méthode de Kumagawa (supériorité de l'alcool chaud comme solvant extracteur des graisses) se vérifie également pour le lait.

3° D'une façon générale la méthode de Kumagawa ne dose avec certitude que les acides gras solides à partir de l'acide laurique, de sorte que pour le lait elle est pratiquement en défaut.

4° L'extraction alcoolique au Soxhlet donne des résultats très voisins de ceux de la méthode de Kumagawa. C'est donc

l'utilisation de l'alcool bien plus que le dispositif d'extraction qui confère la supériorité à la méthode des chimistes japonais.

II. — Dans la deuxième partie de ce travail nous avons d'abord rappelé les recherches antérieures, caractérisées par d'étonnantes contradictions. Puis nous avons exposé des notions préliminaires indispensables sur le dosage, les critériums de pureté et l'hydrolyse des phosphatides.

De l'étude même des phosphatides du lait, qui fait l'objet des chapitres IV et V, se dégagent les conclusions suivantes:

1° Contrairement aux chiffres donnés par la plupart des auteurs, nous avons trouvé une teneur moyenne de 300 mgr. de phosphatides par litre de lait et cela en employant les procédés d'extraction les plus variés.

2° La détermination du phosphore lipoïdique peut se faire de différentes manières à condition d'éliminer soigneusement le phosphore minéral et protéique. Pour des raisons de commodité et de rapidité, nous avons proposé la méthode d'Adam en tant que procédé d'extraction. Quant au dosage du phosphore proprement dit, nous avons mis au point une technique volumétrique qui s'apparente au « Micro-Neumann ».

3° Pour la purification des phosphatides nous avons adopté une méthode basée sur la précipitation du lait par l'acide acétique, le dégraissage du coagulum par l'éther et l'extraction des phosphatides par l'alcool. L'extrait alcoolique est ensuite soumis à la précipitation fractionnée par l'acétone et le chlorure de magnésium. De cette façon on obtient, avec 50 % de pertes, 150 mgr. environ de phosphatides au litre renfermant encore à peu près 20 % d'impuretés.

4° Les phosphatides du lait forment avec les protides des complexes colloïdaux ou s'unissent à eux par des liens chimiques relativement fragiles, pour donner des combinaisons insolubles dans l'éther, mais dissociées par l'alcool et l'acétone.

5° L'hydrolyse des phosphatides du lait est incomplète dans les conditions habituelles. Le facteur limitatif semble être une oxydation partielle au cours de la saponification.

Il est évident que ces quelques points établis ne font qu'amorcer l'étude des phosphatides du lait. Faut-il voir dans ces corps

un simple déchet du métabolisme lipidique, excrété au niveau de la glande mammaire tout comme il existe dans le lait des déchets azotés (urée, créatinine, etc.), ou au contraire représentent-ils un élément quantitativement et qualitativement constant, comme c'est le cas pour les autres tissus des homéothermes: ce sont là autant de problèmes qu'il nous reste à résoudre.

Vu et bon imprimer:
Strasbourg, le 18 juillet 1933
Le Président du Jury,
E. Lobstein.

Vu et approuvé:
Strasbourg, le 22 juillet 1933
Le Doyen
de la Faculté de Pharmacie,
E. Lobstein.

Vu et permis d'imprimer:
Strasbourg, le 27 juillet 1933.
Pour le Recteur de l'Académie,
Le Vice-Président du Conseil de l'Université,
E. Rothe.

Index bibliographique.

Abréviations:

B.S.P.: Bulletin des Sciences Pharmacologiques.
C.R.S.: Comptes rendus de l'Académie des Sciences.
J.P.C.: Journal de Pharmacie et de Chimie.
Z.U.N.G.: Zeitschrift für Untersuchung der Nahrungs- u. Genussmittel.

(1) ADAM (A.). — Instruction pour le dosage pondéral et volumétrique du beurre dans le lait et pour l'analyse complète de ce liquide au moyen du galactotimètre du Dr A. Adam. J.P.C. 1881, 5e série, t. 3, p. 23-32.

(2) ADAMS. — Analyst 1885, t. 10, p. 46.

(3) AJORDAN (J.). — Ein neuer Apparat zur raschen und sicheren Bestimmung des Fettgehaltes der Milch. Z.U.N.G. 1907, t. 14, p. 588.

(4) AMBERGER (C.). — Beiträge zur Kenntnis der Glyceride des Butterfettes.
I Z.U.N.G. 1913, t. 26, p. 66-85.
II Z.U.N.G. 1918, t. 35, p. 313-381.

(5) ARNOLD (W.). — Zur Bestimmung von Fettsäuren auf Grund ihrer Flüchtigkeit mit Wasserdämpfen. Z.U.N.G. 1921, t. 42, p. 345.

(6) BAB (H.). — Die Colostrumbildung als physiologisches Analogon zu Entzündungsvorgängen mit historischen Darlegungen. Thèse Doct. Méd. Leipzig 1904, 4 mars.

(7) BABCOCK (Méthode de). — Les méthodes officielles américaines d'analyse du lait. Le Lait, 1926, t. 6, p. 54.

(8) BAKKE (et KOESTLER). — Le contenu des matières solides du lait, calculé et trouvé analytiquement. Le Lait, 1923, t. 3, p. 112.

(9) BAUDRIMONT (et CHEVALLIER). — Dictionnaire des altérations et falsifications des substances alimentaires. Paris, Asselin, édit. 1878.

(10) BAUMHAUER. — Nouveau mode d'analyse du lait. J. de Chim. médic., 1863, t. 9, 4e série, p. 447.

(11) BECK (et WACKER). — Recherches sur la teneur en cholestérine du lait de femme et de vache. Ztschr. f. Kinderheilkunde 1921 et 1922, in Le Lait, 1923, t. 3, p. 32.

(12) BELIN (P.). — Généralité de la distinction entre deux catégories de matières grasses: élément constant et élément variable. Bull. de la Soc. de Chim. biol., 1926, t. 8, p. 1081.

(13) BELLIER (J.). — Neues Verfahren zur Untersuchung der Milch. Z.U.N.G., 1906, t. 11, p. 613.

(14) BERG. — Milchztg., 1903, t. 32, p. 37.

(15) BERG (et ANGERHAUSEN). — Das optische Verhalten des sterinfreien Unverseifbaren der Fette. Z.U.N.G., 1914, t. 28, p. 148.

BERZELIUS. — (Voir FOUASSIER).

(16) BISCHOFF (G.). — Zur Kenntnis der in der Milch vorhandenen Phosphatide Hoppe-Seyler's Ztschr. f. Physiologische Chemie 1928, t. 173, p. 227-232.

(17) BLATHERWICK (et MEIGS and CARY). — Contributions to the Physiology of Phosphorus and Calcium as related to Milk Secretion. Journ. of Biological Chemistry, 1919, t. 31, p. 1.

(18) BLOOR (W.-R.). — Journ. Amer. Chem. Soc. 1914, t. 36, p. 1300-1304.

(19) — Journ. of Biological Chemistry, 1915, t. 22, p. 113.

(20) — Distribution of unsaturated fatty acids in tissues. Journal of Biological Chemistry, 1926, t. 68, p. 33-56. Journal of Biological Chemistry, 1927, t. 72, p. 327-343. Journal of Biological Chemistry, 1928, t. 80, p. 443-454.

(21) BLYTH (et ROBERTSON). — Chem. Ztg., 1889, t. 13, p. 128.

(22) BOEMER (A.). — Beiträge zur Analyse der Fette. Z.U.N.G. 1898, t. 1er, p. 21.

(23) BONDZYNSKI. — Chem. Ztg., 1890, t. 14, p. 20.

(24) BOUSSINGAULT. — Annales de chimie et de physique, t. 71.

(25) BORDAS (et TOUPLAIN). — Laiterie, Paris et Liège, Béranger éditeur, 1913.

(26) BORDAS (et RACZKOWSKI). — Sur le dosage de la lécithine dans le lait. C.R.S., 1902, t. 134, p. 1592.

(27) — C.R.S., 1903, t. 136, p. 56.

(28) BOUCHARA (E.). — Précipitation des protides du lait. Thèse Doct. Pharm., Paris, 1931, Mechelinck, édit.

(29) BREMER (et GREIFENHAGEN). — Abgeänderter Apparat zur Fettbestimmung in der Milch nach Röse-Gottlieb. Z.U.N.G., 1912, t. 24, p. 580.

(30) BRIOUX. — Ann. Chim. analyt., 1911, p. 371.

(31) BRODRICK-PITTARD (N.-A.). — Zur Methodik der Lecithinbestimmung in Milch. Biochem. Ztschr., 1914, t. 67, p. 382.

BRUNNER. — (Voir MULLER).

(32) BUROW (R.). — Der Lecithingehalt der Milch und seine Abhängigkeit vom relativen Hirngewicht des Säuglings. — Ztschr. für Physiologische Chemie, 1900, t. 30, p. 495.

CARY (C.-A.). — (Voir BLATHERWICK).

(33) CHAPMAN (O.-W.). — L'influence de la lécithine dans les produits de laiterie sur la détermination de la teneur en matière grasse. Journ. of Dairy Science, 1928, t. 11, p. 429-435. In Le Lait, 1931, t. 11, p. 411.

(34) CHESNEAU (G.). — Principes théoriques et pratiques d'analyse minérale. Paris et Liège, Béranger édit., 1912.

CHEVALLIER. — (Voir BAUDRIMONT).

(35) CHEVALLIER (et HENRY). — Mémoire sur le lait. J. de Chim. médicale, 1839, t. 5, p. 145 et 220.

(36) CHEVREUL. — Diction. des Sc. nat., t. 25, p. 144.

(37) CLAUSNITZER (et MAYER). — Ztschr. f. analyt. Chem. t. 19, p. 367.

(38) DE COLLO (et SCOPINARO). — La présence de mélanges de glycérides dans le beurre, provenant du lait de vache. Annali chim. appl., 1929, t. 19, p. 55-65. In Le Lait, 1930, t. 30, p. 929.

(39) Dictionnaire universel de Matière Médicale et de Thérapeutique générale; par Mérat et de Lens. Paris, Baillère édit. 1832.

(40) DIETRICH. — Ztschr. für angew. Chem., 1889, p. 413.

(41) DONNE. — C.R.S., 1843, t. 17. Voir également CHEVALLIER et BAUDRIMONT.

(42) DONS (R.-K.). — Studien über einige Butterfettsäuren. Z.U.N.G., 1908, t. 16, p. 705.

(43) DORLENCOURT (et PALFY). — Recherches sur les variations physiolgiques du taux de la cholestérine dans le colostrum humain. C.R. de la Soc. de Biol., 1925, t. 92, p. 70. — Recherches sur les variations physiologiques du taux de la cholestérine dans le lait de femme; ibid. p. 239.

(44) DUCLAUX. — Le Lait, Paris, 1887.

(45) DUFLOS. — Chem. Apothekerbuch, Breslau, 1844.

(46) EICHLOFF (et GRIMMER). — Milchw. Zentralbl., 1910, t. 6, p. 114.

(47) FARNSTEINER (K.). — Die Milchfettbestimmung nach Gottlieb. Z.U.N.G., 1904, t. 7, p. 105.

(48) FESER. — Die poliz. Control. der Marktmilch, Leipzig, 1878.

(49) FJORD. — Landw. Ztg., 1886, t. 35, p. 129.

(50) FLEISCHMANN. — J. f. Landw., 1885, p. 251.

(51) FLUEGGE (C.). — Hygienische Untersuchungsmethoden; Leipzig, Veit édit., 1881.

(52) FOUARD. — Nouvelle méthode de dosage de la matière grasse du lait. J.P.C., 1904, t. 20, p. 420.

(53) FOUASSIER. — L'analyse du lait au dix-huitième siècle; Le Lait, 1922, t. 2.

(54) FOX (et GARDNER). — Biochemical Journal, 1923, 1924.

(55) FUJII (N.). — Studies on physico-chemical properties of phospholipin. J. of Biochem., 1924, t. 3, p. 393.

(56) GANTTER. — Ztschr. analyt. Chem. 1887, p. 677.
GARDNER (et FOX). — (Voir FOX).

(57) GERBER. — Chem. Ztg., 1892, t. 16, p. 1101.

(58) GLIKIN (W.). — Zur biologischen Bedeutung des Lecithins. — Ueber den Lecithin- und Eisengehalt in der Kuh- und Frauenmilch. Biochem. Ztschr. 1909, t. 21, p. 348.

(59) GORODETZKY (J.). — Ztschr. f. angew. Chem. 1890, 14.

(60) GOTTLIEB (E.). — Landw. Versuchs-Station, 1892, t. 40, p. 6.
GRANDEAU et KUEHN. — (Voir HINARD).
GREIFENHAGEN. — (Voir BREMER).
GRIMMER. — (Voir EICHLOFF).
GRUEN. — (Voir HALDEN).

(61) GUILLOT (L.). — Nouvelle méthode rapide d'analyse du lait. B.S.P., 1900, t. 1er, p. 201-207.

(62) HAENSEL (et NERKING). — Der Lecithingehalt der Milch. — Biochem. Ztschr. 1908, t. 13, p. 348-353.

(63) HALDEN (et GRUEN). — Analyse der Fette und Wachse. II. Band, Berlin, J. Springer édit, 1929.

(64) HAIDLEN (J.). — Ueber die Salze und die Analyse der Kuhmilch. Annalen der Chem. und Pharm., 1843, t. 45, p. 263.

(65) HALENKE (et MOESLINGER). — Ber. über d. 4. Vers. bay. Chem. 1886, 110.

HATTERER (Ch.). — (Voir TERROINE (E.-F.).

(66) HEINTZ. — Sur la composition du beurre de vache. J.P.C., 1854, t. 25, p. 81.

HENRY. — (Voir CHEVALLIER).

(67) HESS (et HELMAN). — The Phosphatide and Total Phosphorus Content of Woman's and Cow's Milk. J. of Biol. Chem., 1925, t. 64, p. 781.

(68) HEUSNER. — Nied. Corr. Bl., t. 6, p. 75.

(69) HILDITCH. — Biochem. Journ., 1930, t. 34, p. 1098.
— Biochem. Journ., 1931, t. 35, p. 507.

(70) HINARD (G.). — Analyse des laits. Paris, Masson édit.

HOFFMEISTER. — (Voir KOENIG).

HOMBERT. — (Voir FOUASSIER).

HOPPE-SEYLER. — (Voir KOENIG).

(71) HOYBERG (M.). — Influence de la vitesse de rotation des centrifuges dans le procédé Gerber. in Le Lait, 1925, t. 5, p. 440.

(72) HOYBERG (Méthode de). — Le Lait, 1921, t. 1er, p. 407 et 531.
Le Lait, 1923, t. 3, p. 177.
Le Lait, 1926, t. 6, p. 517 et 639.
Le Lait, 1928, t. 8, p. 678.

(73) INABA (R.). — Ueber die Fettbestimmungen der Faeces und einiger Nahrungsmittel nach der neuen Methode von Kumagawa-Suto. Biochem. Ztschr., 1908, t. 8, p. 348-355.

(74) KIRSTEN (A.). — Beiträge zur Untersuchung und Kenntniss der Zusammensetzung des Milchfettes. Z.U.N.G., 1902, t. 5, 833-856.

(75) KLEIN. — Berichte d. Milchw. Inst. zu Proskau, 1988-89.

(76) KLEINMANN (H.).— Ueber die Bestimmung der Phosphorsäure. Biochem. Ztschr., 1919, t. 99, p. 19-190.

(77) KLING (A.). — Expertises chimiques, t. 1er et 2, Paris, Dunod, édit., 1921.

(78) KLOSTERMAN (et OPITZ). — Ueber das Cholesterin und seine Bestimmung in Fetten. Z.U.N.G., 1914, t. 27, p. 713-723.

(79) KOENIG (J.). — Chemie der menschlichen Nahrungs- und Genussmittel, t. 3., Berlin, J. Springer édit., 1914.

KOESTLER. — (Voir BAKKE).

KROCKER. — (Voir FLUEGGE).

KUEHN. — (Voir HINARD).

(80) KUMAGAWA (et SUTO). — Ein neues Verfahren zur quantitativen Bestimmung des Fettes und der unverseifbaren Substanzen in tierischem Material nebst Kritik einiger gebräuchlichen Methoden. Biochem. Ztschr. 1908, t. 8, p. 212.

Laboratoire municipal de Paris. — (Voir KLING).

(81) LAVAL (PATRIK DE). — (Voir NILSON, Chem. Ztg. 1891, t. 15, p. 649).

(82) LE CANU. — Note concernant l'analyse du lait. J.P.C., 1839, t. 25, p. 201.

(83) LECOMTE (Dr). — Nouveau procédé d'analyse du lait. J. de Chim. méd., 1854, t. 10, p. 577.

(84) LE COMTE (O.). — Du dosage pondéral du beurre dans le lait au moyen du sulfate de soude anhydre. J.P.C., 1901, t. 13, p. 58.
LEFELDT. — (Voir FLUEGGE.)

(85) LEMELAND (P.). — Recherches chimiques et physiologiques sur les matières grasses et les lipoïdes du sang. Bull. de la Soc. de Chim. biol., 1921, t. 3, p. 134.
— Recherches chimiques et physiologiques sur le dosage des lipoïdes. Etude critique de la méthode de Kumagawa-Suto. Bull. de la Soc. de Chim. biol. 1922, t. 4, p. 300.

(86) LERCH (J.-U.). — Ueber die flüchtigen Säuren der Butter. Ann. der Chem. und Pharm., 1844, t. 49, p. 223.
LESPAGNOL. — (Voir POLONOVSKI).

(87) LEVENE (et WEST). — Cephalin. II. Brain Cephalin. Journ. of biol. Chem., 1916, t. 24, p. 41-53.

(88) LEVY (et KLEIN). — Biochem. Ztschr., 1910, t. 29, p. 465.

(89) LEWKOWITSCH (J.). — Chemical Technology and Analysis of oils, fats and waxes. Londres, Macmilan et Cie, édit., 1904; traduit par Bontoux, Paris, Dunod et Pinat, édit., 1918.

(90) LEZE (R.). — Répert. Pharm. ,1901, t. 57, p. 1.

(91) LINDET. — Nouveau procédé de dosage de la matière grasse dans les produits de la laiterie. J.P.C., 1900, t. 11, p. 368.
LINDSTROEM. — (Voir VIETH).

(92) LOBSTEIN (E.). — Recherches biochimiques sur le bacille tuberculeux. Thèse Doct. ès-sciences, Strasbourg, 1922.

(93) LUHRIG (H.). — Milchw. Zentralbl., 1922, Nr. 14 und 15; in Le Lait, 1923, t. 3, p. 469.

(94) MACHEBOEUF (M.). — Méthode permettant le dosage exact du phosphore dans de petites quantités de sang. Bull. biol. 1926, t. 8, p. 464.

(95) MAC LEAN (H.). — Lecithin and allied substances. The lipins. Monographs on Biochemistry. Longmans, Green et Cie, London, 1918 .

(96) MAGLIANO (et PORZIO). — Méthode pratique pour le dosage de la matière grasse du lait. Le Lait, 1927, t. 7, p. 713.

(97) MARCHAND (E.). — Nouvelle méthode de dosage du beurre dans le lait. J.P.C., 1854, t. 26, p. 344-352.
MAYER. — (Voir CLAUSNITZER).
MAYNARD. — (Voir PORCHER).

(98) MAURICE (et PIEN). — Le dosage de la matière grasse dans les laits écrémés. Le Lait, 1932, t. 12, p. 269.
MEHU. — (Voir BAUDRIMONT).
MEIGS. — (Voir BLATHERWICK).

(99) MEILLERE (G.). — Dosage du beurre et détermination des constantes ou indices physico-chimiques du lait. J.P.C., 1904, t. 19, p. 572.
MOESLINGER. — (Voir HALENKE).

(100) MUELLER (C.). — Anleitung zur Prüfung der Kuhmilch. Berne, Haller édit., 1872.

(101) NAHM. — Milch Ztg., 1894, t. 23, p. 555.

(102) NAUMANN. — Milch Ztg., 1900, t. 29, p. 50.

(103) NERKING (J.). — Zur Methodik der Lecithinbestimmung. Biochem. Ztschr., 1910, t. 23, p. 262.
NERKING. — (Voir HAENSEL).
(104) NJEGOVAN (V.). — Zur Bestimmung der Phosphatide in der Milch. Biochem. Ztschr., 1910, t. 29, p. 491.
— Enthält die Milch Phosphatide?. Biochem. Ztschr., 1913, t. 54, p. 78.
OPITZ. — (Voir KLOSTERMANN).
(105) Ordonnances de police concernant la vente du lait. In VERNOIS (M.). Traité pratique d'Hygiène industrielle. Paris, Baillère édit., 1860.
(106) ORFILA (M.-P.). — Elemens de Chimie Médicale. Paris, Crochard édit., t. 2, p. 341, 1817.
(107) OSBORNE (et WAKEMAN). — Some new constituents of milk: the phosphatides of milk. J. of biol. Chem., 1915, t. 21, p. 539.
— The distribution of phosphatides in milk. J. of biol. Chem. 1916, t. 28, p. 1.
(108) OTTO (J.). — Zur Milchprüfung. Annal. der Chem. und Pharm., 1857, t. 102, p. 57-66.
(109) PAGET (M.). — Etude de la teneur en matière grasse des laits de vaches de race flamande dans la région des Flandres. Le Lait, 1928, t. 8, p. 288.
PALFY. — (Voir DORLENCOURT).
(110) PARNAS (et WAGNER). — Biochem. Ztschr., 1921, t. 125, p. 253.
(111) PELIGOT. — Annal. de chim. et de phys., 1836, t. 62, p. 61.
(112) PETERSEN (et THURSTON). — Les lipides et les stérols comme sources d'erreur dans la détermination de la teneur en matière grasse du babeurre par les méthodes d'extraction à l'éther. J. of Dairy Sc., 1928, t. 11, p. 270; in Le Lait, 1931, t. 11, p. 178.
(113) PICHON-VENDEUIL. — Sur les amino-acides du lait. B. S. P., 1921, t. 28, p. 361.
PIEN. — (Voir MAURICE.)
(114) PIERRE. — Ann. Chim. analyt., t. 9, p. 92 et 260.
(115) POLONOVSKI (et LESPAGNOL). — Sur une semi-micro-méthode d'analyse rapide et complète du lait de femme. Bull. de la Soc. de Chim. biol., 1930, t. 12, p. 1195.
(116) PORCHER (et CHEVALLIER). — La répartition des matières salines dans le lait, leurs relations physiques et chimiques avec les autres principes du lait. Le Lait, 1923, t. 3, p. 97-112, 188-200, 289-306.
(117) PORCHER (et COMBY). — Emploi de l'acétone dans l'analyse biologique du lait. Le Lait, 1930, t. 10, p. 481.
(118) PORCHER (et MAYNARD). — La graisse du sang et la graisse du lait pendant la lactation. Le Lait, 1930, t. 10, p. 601 et 765.
(119) PREGL (F.). — La micro-analyse organique quantitative; traduit par G. Welter, Paris, Les Presses Universitaires de France, édit., 1923.
(120) QUESNEVILLE (Dr.). — Moniteur scientifique, 1902, p. 569.
(121) QUEVENNE (T.-A.). — Mémoire sur le lait. Annales d'Hygiène Publique et de Médecine légale, 1841, t. 26, p. 5 et 258.

RACZKOWSKI. — (Voir BORDAS.)
REISCHAUER. — (Voir FLUEGGE.)
(122) REISS (F.). — Nach welchem Massstabe ist die Gerber'sche Butyrometerskala kalibriert? Z.U.N.G., 1918, t. 36, p. 273.
(123) RICHARD (F.). — Analyse de la poudre de lait. Le Lait, 1926, t. 6, p. 86.
(124) RIETER (E.). — Neuer Apparat zur Milchfettbestimmung nach Gottlieb-Roese. Z.U.N.G., 1907, t. 13, p. 570.
(125) RITTHAUSEN (H.). — Journ. f. prakt. Chem. (2), t. 15, p. 329.
(126) ROBERT (P.) — Etude comparative des différentes méthodes d'extraction des lipides. Thèse Doct. Pharm., Strasbourg, 1931.
(127) ROBERTSON. — (Voir BLYTH).
(128) ROEDER (G.). — Gerber ou Babcock? Le Lait, 1927, t. 7, p. 354.
(129) — Contribution à l'éclaircissement du problème du butyromètre. Le Lait, 1929, t. 9, p. 1078.
(130) ROEHRIG (A.). — Verbesserter Apparat zur Milchfett-Bestimmung nach Gottlieb-Röse. Z.U.N.G., 1905, t. 9, p. 531.
ROEHRIG (P.). — (Voir TERROINE.)
(131) ROESE. — Ztschr. f. angew. Chemie, 1889, 100.
ROESE-GOTTLIEB (Méthode de). — Les méthodes officielles américaines d'analyse du lait. Le Lait, 1926, t. 6, p. 54, voir (7).
RUFI. — (Voir BONDZYNSKI.)
(132) SALGUES (A.). — Contribution à l'étude de la cholestérine dans les laits, les beurres et les fromages. Thèse Doct. Pharm., Toulouse, 1931.
(133) SALKOWSKI (E). — Ztschr. analyt. Chem., 1887, t. 26, p. 557.
SALLERON. — (Voir FLUEGGE.)
(134) SANO (M.). — Phosphatides of the fish sperm. J. of Biochem., 1922, t. 1, p. 1.
(135) SCHLOSSMANN. — Ztschr. f. physiol. Chem., t. 47, p. 327.
(136) SCHMID (W.). — Bestimmung des Fettgehaltes in Milch, Rahm und dergl. Ztschr. f. analyt. Chem., 1888, t. 27, p. 464.
(137) SCHMIDT (et TOLLENS). — Ueber die Fettbestimmungen in der Milch mittels des Lactobutyrometers, 1878, t. 17, p. 238.
(138) SCHOONJANS (A.). — Note sur le dosage de la matière grasse dans les poudres de lait. Le Lait, 1925, t. 5, p. 782.
(139) SCHUSTER (G.). — Composition du beurre de vache. J. P. C., 1932, t. 16, p. 465.
SCOPINARO. — (Voir DE COLLO.)
SEIDLITZ. — (Voir FLUEGGE.)
(140) SICHLER (M.). — Sinacidbutyrométrie, nouveau procédé de dosage des corps gras. J.P.C., 1905, t. 21, p. 368.
(141) SIEGFELD (M.). — Welche Veränderungen erleidet das Milchfett bei der acidbutyrometrischen Bestimmung nach Gerber? Z.U.N.G., 1910, t. 19, p. 39.
(142) — Untersuchungen über die Zusammensetzung des Butterfettes. Z.U.N.G., 1912, t. 24, p. 453.
(143) SOERENSEN (M.). — On the determination of small quantities of Phosphorus in proteins. Comptes rendus du Laboratoire de Carlsberg, vol. 15, n° 10.

(144) SOXHLET. — Ztschr. d. landw. Vereins in Bayern, 1880, p. 659, et 1882, p. 18.
— (Voir FLUEGGE.)
(145) SPUR (B.). — Modification et simplification du procédé proposé par M. le Dr Hoyberg, pour la détermination de la matière grasse dans le lait et la crème. Le Lait, 1926, t. 6, p. 517 et 639.
(146) STOKLASA (J.). — Zur Kenntnis des Phosphors in der Frauen- und Kuhmilch. Ztschr. f. physiol. Chem., 1897, t. 23, p. 343.
SUTO. — (Voir KUMAGAWA.)
(147) TERROINE (E.-F.). — Annales de la Science Agronomique française et étrangère. Juillet-août 1926.
(148) TERROINE (et HATTERER et ROEHRIG). — Les acides gras des phosphatides chez les animaux poïkilothermes, les végétaux supérieurs et les microorganismes. Bull. de la Soc. de Chim. biol., 1930, t. 12, p. 682.
(149) THOERNER (W.). — Chem. Ztg., 1892, t. 16, p. 1101.
THURSTON. — (Voir PETERSEN.)
(150) TIMPE (H.). — Die analytischen Methoden der Milchuntersuchung und ein neues Verfahren zur gleichzeitigen Untersuchung auf Trockensubstanz, Fett und Asche. Z.U.N.G., 1900, t. 3, p. 340.
(151) — Chem. Ztg., 1894, t. 18, p. 392.
TOLLENS. — (Voir SCHMIDT.)
(152) TOLMATSCHEFF. — Zur Analyse der Milch. Hoppe-Seyler's med. chem. Unters., 1867, t. 2, p. 272.
TOUPLAIN. — (Voir BORDAS.)
(153) TSVETT. — Sur la liquéfaction réversible des albuminoïdes. C.R.S., 129, p. 551.
(154) VAN DER BURG (B.). — La vitesse de la rotation de la centrifuge lors de la détermination de la teneur en matière grasse du lait par la méthode de Gerber, in Le Lait, 1927, t. 7, p. 775.
(155) VIETH. — Die Milchprüfungs-Methoden und die Kontrolle der Milch in Städten, Bremen, 1879.
(156) VILLIERS (et COLLIN et FAYOLLE). — Aliments lactés et aliments gras, Paris, Doin, édit., 1911.
(157) VLADESCO (R.). — La solubilisation de la matière organique du lait. Ses applications. Le Lait, 1925, t. 5, p. 479.
(158) VOGEL. — Eine neue Milchprobe. Erlangen, 1862.
WACKER. — (Voir BECK.)
WAGNER. — (Voir PARNAS.)
WAKEMAN. — (Voir OSBORNE.)
(159) WENDLER (Dr.). — Voir Z.U.N.G., 1906, t. 12, p. 242: Eine neue Schnellmethode zur Milchfettbestimmung (Sal-Methode nach Dr. Wendler.)
WEST. — (Voir LEVENE.)
(160) WICKE (W.). — Ueber den Wasser- und Fettgehalt der Ziegenmilch zu verschiedenen Tageszeiten. Annal. der Chem. und Pharm., 1856, t. 98, p. 124.
WOLLNY. — (Voir NAUMANN.)
(161) WOODS (et KOCH). — The Quantitative Estimation of the Lecithans. J. of. biol. Chem., 1905-1906, t. 1, p. 203.

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION 1

PREMIERE PARTIE

Dosage des matières grasses du lait

CHAPITRE PREMIER. — Aperçu historique 3
I. Période empirique 3
II. Période scientifique 5
A. Différentes méthodes de dosage 5
B. Constitution des Matières grasses du lait 7

CHAPITRE II. — Méthodes de dosage des matières grasses du lait 11
I. Méthodes volumétriques 11
A. Crémomètres 12
B. Méthodes chimiques sans centrifugation 12
C. Méthodes chimiques avec centrifugation 16
II. Méthodes pondérales 18
A. Extraction du beurre par épuisement du lait desséché 19
B. Extraction du beurre par épuisement du lait alcalinisé 20
C. Extraction du beurre par épuisement du lait acidifié 22
D. Extraction du beurre par épuisement du lait coagulé 22
III. Méthodes densimétriques 23
IV. Méthodes optiques 24
A. Opacimètres 25
B. Méthode réfractométrique 26
V. Méthodes indirectes par calcul 26
IV. Microméthodes 27

CHAPITRE III. — Etude critique et Recherches personnelles .. 29
I. Etude des méthodes indirectes 30
II. Etude des méthodes pondérales 32
III. Recherches personnelles 34
A. Technique des méthodes employées 35
B. Recherches et résultats expérimentaux 39
C. Discussion des résultats 40
IV. Conclusions 53

DEUXIEME PARTIE

Les Phosphatides du lait

CHAPITRE PREMIER. — Historique 55
CHAPITRE II. — Généralités sur les Phosphatides 65
CHAPITRE III. — Etude d'une méthode de microdosage du Phosphore lipoïdique 71
I. Influence de l'acidité 72
II. Influence de la concentration du Phosphore 75
III. Application au dosage du Phosphore lipoïdique 75
IV. Technique de la méthode 78
CHAPITRE IV. — Dosage du Phosphore lipoïdique dans le lait .. 81
I. Précipitation et extraction alcooliques 82
II. Précipitation et extraction éthéro-alcooliques 82
III. Précipitation acétique et extraction alcoolique 84
IV. Précipitation acétique et extraction éthérée ou alcoolique 84
V. Précipitation par l'acide silicotungstique et extraction alcoolique 85
VI. Extractions éthéro-alcooliques en milieu alcalin 85
VII. Conclusion 87
CHAPITRE V. — Purification des Phosphatides 89
I. Précipitation alcoolique du lait 89
II. Précipitation acétonique du lait 90
III. Précipitation acétique du lait 90
A. Précipitation fractionnée par l'acétone 91
B. Extraction chloroformique 91
IV. Caractères des Phosphatides du lait 94
A. Hydrolyse 94
B. Indice d'iode 95
V. Conclusion 96
RESUME ET CONCLUSIONS GENERALES 99
INDEX BIBLIOGRAPHIQUE 103